

USE OF COMPOSITIONS CONSISTING OF CATIONIC COMPOUNDS AND PROTON DONORS FOR STABILISING AND/OR ISOLATING NUCLEIC ACIDS IN OR FROM MICRO-ORGANISMS SUCH AS PROKARYOTS, FUNGI, PROTOZOA OR ALGAE

Publication number: WO0200600

Publication date: 2002-01-03

Inventor: OELMUELLER UWE (DE); WILLE TANJA (DE)

Applicant: QIAGEN GMBH (DE); OELMUELLER UWE (DE); WILLE TANJA (DE)

Classification:






- international: C12N15/09; C07C211/62; C07C211/63; C07C211/64; C07F9/54; C12N15/00; C12N15/10; C12P19/34; G01N33/50; C12R1/19; C12N15/09; C07C211/00; C07F9/00; C12N15/00; C12N15/10; C12P19/00; G01N33/50; (IPC1-7): C07C211/62; C12N15/10

- European: C12N15/10A; C07C211/62; C07C211/63; C07C211/64; C07F9/54

Application number: WO2001EP07281 20010626






Priority number(s): DE20001031236 20000627

Also published as:

 WO0200599 (A1)
 US7270953 (B2)
 US6861213 (B2)
 US2004014703 (A1)
 US2003165943 (A1)

more >>

Cited documents:

 US5891921
 GB1289426
 US5275708
 EP0606712
 US5300635

more >>

Report a data error here

Abstract of WO0200600

The invention relates to the use of compositions for isolating and/or stabilising nucleic acids in or from micro-organisms such as prokaryots, fungi, protozoa or algae. The composition comprises a cationic compound of general formula $Y\langle + \rangle R_1R_2R_3R_4 X'$ as an essential constituent; wherein Y can represent nitrogen or phosphorus; R₁, R₂, R₃ and R₄ can independently represent an unbranched or branched C₁-C₂₀ alkyl radical and/or a C₆-C₂₀ aryl radical and a C₆-C₂₆ aralkyl radical; and X' can represent an anion pertaining to an inorganic or organic, monobasic or polybasic acid.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
3. Januar 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/00600 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07C 211/62,
C12N 15/10

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/07281

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. Juni 2001 (26.06.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 31 236.5 27. Juni 2000 (27.06.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **QIAGEN GMBH** [DE/DE]; Max-Volmer-Strasse 4,
40724 Hilden (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **OELMÜLLER,**
Uwe [DE/DE]; Millrather Weg 46, 40699 Erkrath (DE).
WILLE, Tanja [DE/DE]; Cormeniusweg 8, 40723 Hilden
(DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **QIAGEN GMBH;**
Max-Volmer-Strasse 4, 40724 Hilden (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: USE OF COMPOSITIONS CONSISTING OF CATIONIC COMPOUNDS AND PROTON DONORS FOR STABILIS-
ING AND/OR ISOLATING NUCLEIC ACIDS IN OR FROM MICRO-ORGANISMS SUCH AS PROKARYOTS, FUNGI, PRO-
TOZOA OR ALGAE

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON KOMPOSITIONEN AUS KATIONISCHEN VERBINDUNGEN UND PROTONEN-
DONOREN ZUR STABILISIERUNG UND/ODER ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN IN BZW. AUS MIKROORGANIS-
MEN - WIE PROKARYONTEN, PILZEN, PROTOZOEN ODER ALGEN

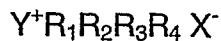
(57) Abstract: The invention relates to the use of compositions for isolating and/or stabilising nucleic acids in or from micro-organ-
isms such as prokaryots, fungi, protozoa or algae. The composition comprises a cationic compound of general formula $Y^+R_1R_2R_3R_4$
 X^- as an essential constituent; wherein Y can represent nitrogen or phosphorus; R_1 , R_2 , R_3 and R_4 can independently represent an
unbranched or branched C_1 - C_{20} alkyl radical and/or a C_6 - C_{20} aryl radical and a C_6 - C_{26} aralkyl radical; and X^- can represent an anion
pertaining to an inorganic or organic, monobasic or polybasic acid.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Kompositionen zur Isolierung und/oder Stabili-
sierung von Nukleinsäuren in bzw. aus Mikroorganismen - wie Prokaryonten, Pilzen, Protozoen oder Algen. Die Komposition
umfaßt als einen wesentlichen Bestandteil eine kationische Verbindung der allgemeinen Formel $Y^+R_1R_2R_3R_4X^-$ worin, Y Stickstoff
oder Phosphor, R_1 , R_2 , R_3 und R_4 unabhängig voneinander einen unverzweigten oder verzweigten C_1 - C_{20} -Alkylrest und/oder einen
 C_6 - C_{20} -Arylrest sowie einen C_6 - C_{26} -Aralkylrest und X^- ein Anion einer anorganischen oder organischen, ein- oder mehrbasischen
Säure bedeuten können.

WO 02/00600 A1

Verwendung von Kompositionen aus kationischen Verbindungen und Protonendonoren zur Stabilisierung und/oder Isolierung von Nukleinsäuren in bzw. aus Mikroorganismen - wie Prokaryonten, Pilzen, Protozoen oder Algen

Die vorliegende Erfindung betrifft eine neue Verwendung von Kompositionen die als einen wesentlichen Bestandteil eine kationische Verbindung der allgemeinen Formel



worin

Y Stickstoff oder Phosphor

R₁, R₂, R₃ und R₄ unabhängig voneinander einen unverzweigten oder verzweigten C₁-C₂₀-Alkylrest und/oder einen C₆-C₂₀-Arylrest sowie einen C₇-C₂₆-Aralkylrest und

X⁻ ein Anion einer anorganischen oder organischen, ein- oder mehrbasischen Säure

bedeuten können

und mindestens einem Protonendonator als Additiv zur Stabilisierung und/oder Isolierung von RNA und/oder DNA aus Mikroorganismen - wie Prokaryonten, Pilzen, Protozoen oder Algen.

Bevorzugt sind Kompositionen, in denen die kationische Verbindungen aus einem Ammoniumsalz besteht, in dem R₁ einen höheren Alkylrest - vorzugsweise mit 12, 14 oder 16 - Kohlenstoffatomen und R₂, R₃ und R₄ jeweils eine Methylgruppe bedeutet.

Bevorzugt sind weiterhin Kompositionen, in denen R₁ eine Aralkylgruppe - vorzugsweise eine Benzylgruppe -, R₂ einen höheren Alkylrest - vorzugsweise mit 12, 14 oder 16 Kohlenstoffatomen - und R₃ und R₄ eine Methylgruppe bedeutet.

Als Anionen werden Bromid, Chlorid, Phosphat, Sulfat, Formiat, Acetat, Propionat, Oxalat, Malonat oder Succinat bevorzugt.

C₁-C₆-Alkyl steht im allgemeinen für einen verzweigten oder unverzweigten Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 6 Kohlenstoffatom(en), der gegebenenfalls mit einem oder mehreren Halogenatom(en) - vorzugsweise Fluor - substituiert sein kann, die untereinander gleich oder verschieden sein können. Als Beispiele seien folgende Kohlenwasserstoffreste genannt:

Methyl, Ethyl, Propyl, 1-Methylethyl (iso-Propyl), Butyl, 1-Methylpropyl, 2-Methylpropyl, 1,1-Dimethylethyl, n-Pentyl, 1-Methylbutyl, 2-Methylbutyl, 3-Methylbutyl, 1,1-Dimethylpropyl, 1,2-Dimethylpropyl, 2,2-Dimethylpropyl, 1-Ethylpropyl, Hexyl, 1-Methylpentyl, 2-Methylpentyl, 3-Methylpentyl, 4-Methylpentyl, 1,1-Dimethylbutyl, 1,2-Dimethylbutyl, 1,3-Dimethylbutyl, 2,2-Dimethylbutyl, 2,3-Dimethylbutyl, 3,3-Dimethylbutyl, 1-Ethylbutyl, 2-Ethylbutyl, 1,1,2-Trimethylpropyl, 1,2,2-Trimethylpropyl, 1-Ethyl-1-methylpropyl und 1-Ethyl-2methyl-propyl.

Höherer Alkylrest steht für einen verzweigten oder unverzweigten C₇-C₂₀-Alkylrest der gegebenenfalls mit einem oder mehreren Halogenatom(en) - vorzugsweise Fluor - substituiert sein kann, die untereinander gleich oder verschieden sein können. Als Beispiele seien folgende Kohlenwasserstoffreste genannt: verzweigtes oder unverzweigtes Heptyl, Octyl, Nonyl, Decyl, Undecyl, Dodecyl, Tetradecyl, Hexadecyl, Dodecadecyl und Eicosyl.

C₃-C₆-Alkenyl steht im allgemeinen für einen verzweigten oder unverzweigten Kohlenwasserstoffrest mit 3 bis 6 Kohlenstoffatom(en), mit einer oder ggf. mehreren Doppelbindungen, der gegebenenfalls mit einem oder mehreren Halogenatom(en) - vorzugsweise Fluor - substituiert sein kann, die untereinander gleich oder verschieden sein können. Als Beispiele seien folgende Kohlenwasserstoffreste genannt:

2-Propenyl (Allyl), 2-Butenyl, 3-Butenyl, 1-Methyl-2-propenyl, 2-Methyl-2-propenyl, 2-Pentenyl, 3-Pentenyl, 4-Pentenyl, 1-Methyl-2-butenyl, 2-Methyl-2-butenyl,

3-Methyl-2-butenyl, 1-Methyl-3-butenyl, 2-Methyl-3-butenyl, 3-Methyl-3-butenyl, 1,1-Dimethyl-2-propenyl, 1,2-Dimethyl-2-propenyl, 1-Ethyl-2-propenyl, 2-Hexenyl, 3-Hexenyl, 4-Hexenyl, 5-Hexenyl, 1-Methyl-2-pentenyl, 2-Methyl-2-pentenyl, 3-Methyl-2-pentenyl, 4-Methyl-2-pentenyl, 1-Methyl-3-pentenyl, 2-Methyl-3-pentenyl, 3-Methyl-3-pentenyl, 4-Methyl-3-pentenyl, 1-Methyl-4-pentenyl, 3-Methyl-4-pentenyl, 4-Methyl-4-pentenyl, 1,1-Dimethyl-2-butenyl, 1,1-Dimethyl-2-butenyl, 1,1-Dimethyl-3-butenyl, 1,2-Dimethyl-2-butenyl, 1,2-Dimethyl-3-butenyl, 1,3-Dimethyl-2-butenyl, 1,3-Dimethyl-3-butenyl, 2,2-Dimethyl-3-butenyl, 2,3-Dimethyl-2-Butenyl, 2,3-Dimethyl-3-butenyl, 1-Ethyl-2-butenyl, 1-Ethyl-3-butenyl, 2-Ethyl-1-butenyl, 2-Ethyl-2-butenyl, 2-Ethyl-3-butenyl, 1,1,2-Trimethyl-2-propenyl, 1-Ethyl-1-methyl-2-propenyl und 1-Ethyl-2-methyl-2-propenyl.

C₃-C₆-Alkynyl steht im allgemeinen für einen verzweigten oder unverzweigten Kohlenwasserstoffrest mit 3 bis 6 Kohlenstoffatom(en), mit einer oder ggf. mehreren Dreifachbindungen, der gegebenenfalls mit einem oder mehreren Halogenatom(en) - vorzugsweise Fluor - substituiert sein kann, die untereinander gleich oder verschieden sein können. Als Beispiele seien folgende Kohlenwasserstoffreste genannt:

2-Propinyl (Propargyl), 2-Butinyl, 3-Butinyl, 1-Methyl-2-propinyl, 2-Methyl-2-propinyl, 2-Pentinyl, 3-pentinyl, 4-Pentinyl, 1-Methyl-2-butinyl, 2-Methyl-2-butinyl, 3-Methyl-2-butinyl, 1-Methyl-3-butinyl, 2-Methyl-3-butinyl, 3-Methyl-3-butinyl, 1,1-Dimethyl-2-propinyl, 1,2-Dimethyl-2-propinyl, 1-Ethyl-2-propinyl, 2-Hexinyl, 3-Hexinyl, 4-Hexinyl, 5-Hexinyl, 1-Methyl-2-pentinyl, 2-Methyl-2-pentinyl, 3-Methyl-2-pentinyl, 4-Methyl-2-pentinyl, 1-Methyl-3-pentinyl, 2-Methyl-3-pentinyl, 3-Methyl-3-pentinyl, 4-Methyl-3-pentinyl, 1-Methyl-4-pentinyl, 3-Methyl-4-pentinyl, 4-Methyl-4-pentinyl, 1,1-Dimethyl-2-butinyl, 1,1-Dimethyl-2-butinyl, 1,1-Dimethyl-3-butinyl, 1,2-Dimethyl-2-butinyl, 1,2-Dimethyl-3-butinyl, 1,3-Dimethyl-2-butinyl, 1,3-Dimethyl-3-butinyl, 2,2-Dimethyl-3-butinyl, 2,3-Dimethyl-2-butinyl, 2,3-Dimethyl-3-butinyl, 1-Ethyl-2-butinyl, 1-Ethyl-3-butinyl, 2-Ethyl-1-butinyl, 2-Ethyl-2-butinyl, 2-Ethyl-3-butinyl, 1,1,2-Trimethyl-2-propinyl, 1-Ethyl-1-methyl-2-propinyl und 1-Ethyl-2-methyl-2-propinyl.

Aryl steht - steht sofern nicht anders definiert - für einen aromatischen ein- oder mehrkernigen Rest mit 4 bis 22 C-Atomen, der ggf. ein oder zwei Heteroatome enthalten kann. Als Beispiele seien genannt: Phenyl, Naphthyl, Anthracyl bzw. Pyrol, Furan, Thiophen, Pyridin, Pyridazin, Pyrimidin oder Pyrazin, und der ggf. durch Halogen (F, Cl, Br, J) - vorzugsweise Fluor- oder durch eine Alkylgruppe unabhängig voneinander ein- oder mehrfach substituiert sein kann.

Aralkyl bedeutet einen ein oder mehrkernigen Arylrest im Sinne der vorstehenden Definition der über eine C₁-C₆-Alkyl-, C₃-C₆-Alkenyl- oder eine C₃-C₆-Alkynylbrücke, für welche die Definition der C₁-C₆-Alkyl-, C₃-C₆-Alkenyl und C₃-C₆-Alkynylgruppen entsprechend gelten, an die kationische Partialstruktur gebunden ist. Im Sinne der vorliegenden Erfindung wird die Benzylgruppe bevorzugt.

Als Gegenionen X⁻ eignen sich bevorzugt alle Anionen von Halogenwasserstoffsäuren oder Anionen ein- oder zweibasischer organischer Säuren wie Acetat oder Oxalat, Malonat, Succinat oder Citrat.

Als Protonendonoren im Sinne der vorliegenden Erfindung sind in erster Linie gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren, ungesättigte Alkenyl-carbonsäuren, gesättigte und/oder ungesättigte aliphatische C₂-C₆-Dicarbonsäuren, aliphatische Ketocarbonsäuren oder Ketodicarbonsäuren sowie Aminosäuren neben Mineralsäuren oder deren Salze allein oder in Kombination geeignet. Dabei können alle genannten organischen Säuren in unsubstituierter Form oder als substituierte Derivate eingesetzt werden, worunter - sofern nicht anders angegeben - die unsubstituierten oder ein bzw. mehrfach durch Hydroxyl-Gruppen substituierten Derivate bevorzugt werden.

Als gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren im Sinne der vorliegenden Erfindung werden neben Ameisensäure vorzugsweise C₁-C₆-Alkyl-carbonsäuren verstanden, worunter Essigsäure, Propionsäure, n-Buttersäure, n-Valeriansäure, Isovaleriansäure, Ethyl-methyl-essigsäure (2-Methyl-buttersäure), 2,2-Dimethylpropionsäure (Pivalinsäure), n-Hexansäure, n-Octansäure, n-Decansäure sowie n-Dodecansäure (Laurinsäure) bevorzugt werden. Daneben können auch die

sich von den genannten Säuren sich ableitenden Ketocarbonsäuren Verwendung finden.

Als ungesättigte Alkenyl-carbonsäuren im Sinne der Erfindung seien beispielsweise Acrylsäure (Propensäure), Methacrylsäure, Crotonsäure, iso-Crotonsäure sowie Vinylessigsäure genannt.

Bevorzugt im Sinne der vorliegenden Erfindung sind gesättigte aliphatische C₂-C₆-Dicarbonsäuren, wie zum Beispiel Oxalsäure, Malonsäure, Bersteinsäure, Glutarsäure oder Adipinsäure, worunter Oxalsäure und Bersteinsäure ganz besonders bevorzugt werden.

Besonders bevorzugt werden zur Lösung der erfindungsgemäßen Aufgabe aliphatische Hydroxi-di- und -tricarbonsäuren eingesetzt, worunter Tartronsäure, D-(+)-, L-(-)- oder DL-Äpfelsäure, (2R, 3R)-(+)-Weinsäure, (2S, 3S)-(-)-Weinsäure, meso-Weinsäure und Citronensäure ganz besonders bevorzugt werden.

Zur Lösung der vorliegenden Aufgabe eignen sich daneben auch ungesättigte Dicarbonsäuren wie Malein- oder Fumarsäure oder ungesättigte Tricarbonsäuren, wie zum Beispiel Aconitsäure.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung können jedoch auch aliphatische Ketodicarbonsäuren als Additive eingesetzt werden, wie z. B. Mesoxalsäure und Oxalessigsäure, worunter Oxalessigsäure ganz besonders bevorzugt wird.

Des weiteren können im Sinne der vorliegenden Erfindung Aminosäuren eingesetzt werden, worunter α -Aminosäuren - wie z. B. Aminoessigsäure (Glycin), α -Aminopropionsäure (Alanin), α -Amino-iso-valeriansäure (Valin), α -Amino-iso-capronsäure (Leucin) und α -Amino- β -methylvaleriansäure (Isoleucin) bevorzugt werden. Besonders bevorzugt findet dabei Glycin Verwendung.

Die genannten Protonendonoren können als Einzelsubstanzen bzw. in Form der reinen Stereoisomeren als auch in Mischungen eingesetzt werden.

Als weitere Additive können im Sinne der vorliegenden Erfindung ebenfalls Mineralsäuren und deren Salze eingesetzt werden. Bevorzugt kommen dabei deren Salze von Mineralsäuren - wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure - mit Alkalimetallen oder deren Ammoniumsalze zur Anwendung. Besonders bevorzugt finden dabei Phosphorsäure und Ammoniumsulfat Verwendung.

Tab. 1

Bezeichnung	Formel
Essigsäure	$\text{CH}_3\text{-COOH}$
Oxalsäure	HOOC-COOH
Malonsäure	$\text{HOOC-CH}_2\text{-COOH}$
Tartronsäure	HOOC-CHOH-COOH
Bernsteinsäure	$\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$
Äpfelsäure	$\text{HOOC-CHOH-CH}_2\text{-COOH}$
Weinsäure	$\text{HOOC-CHOH-CHOH-COOH}$
Glutarsäure	$\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$
Adipinsäure	$\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$
Zitronensäure	$\text{HOOC-CH}_2\text{-COHCOOH-CH}_2\text{-COOH}$
Maleinsäure	HOOC-CH=CH-COOH
Oxalessigsäure	$\text{HOOC-CO-CH}_2\text{-COOH}$
Glycin	$\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-COOH}$

Das Additiv kann in unterschiedlichen Konzentrationen in der Komposition vorliegen. Des weiteren ist auch der Einsatz von Kombinationen verschiedener Additive möglich. - Dabei können in Abhängigkeit von der Natur des Additivs sich andere Konzentrationsbereiche als vorteilhaft erweisen. Daneben ist auch der Einsatz von Kombinationen verschiedener Additive möglich.

Die kationische Verbindung weist in der wässrigen Lösung der Komposition eine Konzentration in einem Bereich 0,01 % (w/v) und Sättigung, bevorzugt zwischen 0,1

% und 10 % (w/v) und Sättigung und besonders bevorzugt zwischen 0,5 und 8 % (w/v) und ganz besonders bevorzugt zwischen 2 und 6 % (w/v) auf.

Derartige Kompositionen werden in der Beschreibung der Deutschen Offenlegungsschrift 100 31 236, die der vorliegenden Patentanmeldung als Prioritätsanmeldung zugrundeliegt, sowie in den Patentansprüchen 1 bis 17 offenbart.

Naturgemäß werden bei der Zugabe einer Lösung von kationischer Verbindungen und Additiv die jeweiligen optimalen Konzentrationen durch das jeweilige Volumen der biologischen Probe und das Volumenverhältnis durch das Volumen der Stabilisierungslösung und das der biologischen Probe bestimmt.

Als Nukleinsäuren werden im Sinn der vorliegenden Erfindung – sofern nicht anders angegeben – Nukleinsäuren im breiteren Sinne verstanden, so z.B. Ribonukleinsäuren (RNA) die auch Desoxyribonukleinsäuren in allen Längen oder Konfigurationen – wie Doppelstrang, Einzelstrang, circuläre und lineare DNA umfassen sowie alle möglichen Unterarten, wie z.B. monomere Nukleotide, Oligomere, Plasmide, bakterielle DNA und RNA in prozessierter und unprozessierter Form.

Als biologische Probe können Lebensmittelproben oder Umweltproben, die freie oder gebundene Nukleinsäuren oder Nukleinsäure-haltige Mikroorganismen im Sinne der Erfindung enthalten - wie z. B. Organismen (Ein- oder Mehrzeller; Insekten etc.), Pflanzen und Pflanzenteile, Bakterien, Viren, Hefen und andere Pilze oder Prokaryonten – eingesetzt werden.

Des weiteren können als biologische Probe, welche die Mikroorganismen im Sinne der vorliegenden Erfindung enthält, Plasma, Körperflüssigkeiten, wie beispielsweise Blut, Serum, Zellen, Leukozytenfraktionen, Crusta Phlogistica, Sputum, Urin, Sperma, Faeces, Abstriche, Punktate, Gewebeproben jeder Art - wie z. B. Biopsien -, Gewebeteile und Organe, Lebensmittelproben, die freie oder gebundene Nukleinsäuren oder Nukleinsäure-haltige Zellen enthalten, als Ausgangsmaterial dienen.

Abgesehen davon ist es möglich, Nukleinsäuren, die aus den oben genannten biologischen Proben stammen und die eukaryontischer Herkunft sind, mit den erfindungsgemäßen Kompositionen zu stabilisieren. So ist es möglich, die in der Deutschen Patentanmeldung 100 31 236 (Seite 6, zweiter Absatz der ursprünglich eingereichten Unterlagen) genannten Materialien eukaryontischen Charakters gemäß der Lehre der vorliegenden Erfindung zu isolieren bzw. stabilisieren. Auf diese Weise läßt sich gemäß der Lehre der vorliegenden Erfindung Nukleinsäure eukaryontischer Herkunft, wie zum Beispiel aus Blut, Sputum oder Knochenmark - wie den Beispielen 1 bis 15 sowie den Figuren 1 bis 15 der Deutschen Patentanmeldung 100 31 236 offenbart, auf die hiermit inhaltlich Bezug genommen wird - zu entnehmen ist, erfolgreich stabilisieren.

Das Additiv kann in unterschiedlichen Konzentrationen in dem Stabilisierungsreagenz vorliegen; beispielsweise kann es in Mischungen der Stabilisierungslösung mit Blut in einem Volumenverhältnis von 1:1 - bevorzugt 3:1 in einer Konzentration von 50mM bis zur Sättigung, bevorzugt 100 bis 1M und besonders bevorzugt in einer Konzentration von 200 - 500 mM zugegen sein. Dabei können in Abhängigkeit von der Natur des Additivs sich andere Konzentrationsbereiche als vorteilhaft erweisen. Daneben ist auch der Einsatz von Kombinationen verschiedener Additive möglich.

Die kationische Verbindung weist in der wässrigen Lösung der Komposition eine Konzentration in einem Bereich 0,01 Gew.-% und Sättigung, bevorzugt zwischen 0,1 Gew.-% und Sättigung und besonders bevorzugt zwischen 0,5 Gew.-% und 15 Gew.-% und ganz besonders bevorzugt zwischen 2 Gew.-% und 10 Gew.-% auf.

Naturgemäß werden bei der Zugabe einer Lösung von kationischer Verbindungen und Additiv die jeweiligen optimalen Konzentrationen durch das Volumen der biologischen Probe und das Volumenverhältnis von Stabilisierungslösung zur biologischen Probe bestimmt.

Der pH-Wert der Mischung aus kationischer Verbindung und Additiv – vor dem Mischen mit der Probe - kann in Abhängigkeit von der Probe im allgemeinen über

einen weiten pH Bereich (pH 2 bis 12) variiert werden und liegt bevorzugt in einem Intervall von pH 2 bis pH 10 und besonders bevorzugt in einem Intervall von pH 3 bis 8. Dabei ist der bevorzugte pH-Bereich abhängig von der eingesetzten biologischen Probe. - Für Blut, Plasma und Serum ist ein pH-Wert in einem Bereich zwischen pH 2 und pH 6 und besonders zwischen pH 3 und pH 4 bevorzugt.

Der pH-Wert der Mischung aus kationischer Verbindung und Additiv kann in Abhängigkeit von der Probe die Stabilisierung und/oder Isolierung von Nukleinsäuren in bzw. aus Mikroorganismen - wie Prokaryonten, Pilzen, Protozoen oder Algen - vorgesehen ist, im allgemeinen über einen weiten pH Bereich (pH 2 bis 12) variiert werden und liegt bevorzugt in einem Intervall von pH 2 bis pH 8 und besonders bevorzugt in einem Intervall von pH 2 bis 5. Dabei ist der bevorzugte pH-Bereich abhängig von der eingesetzten Probe.

Für biologische Proben, wie andere zelluläre Körperflüssigkeiten außer Blut, Plasma und Serum, oder z. B. Bakterien, Punktate, Zellen, Gewebe und weiterer biologischer Proben - wie oben beschrieben - liegt der pH-Wert in der Stabilisierungslösung bestehend aus kationischer Verbindung und Additiv bevorzugt in einem Bereich von pH 3 bis pH 10 und besonders bevorzugt in einem Intervall von pH 4 bis pH 8. Dabei ist bei allen pH-Angaben der pH-Wert vor dem Mischen mit der biologischen Probe zu verstehen.

Zur Stabilisierung von Nukleinsäuren in biologischen Proben kann die Probe mit einer Lösung, welche die kationische(n) Verbindung(en) und Additive enthält, vermischt werden. Dabei ist ein Zugabevolumen von 0,1 bis 10.000 Volumen der biologischen Probe möglich; bevorzugt wird ein Zugabevolumen in einem Bereich von 1 bis 1000 und ganz besonders bevorzugt in einem Intervall von 1 bis 100 Volumen. In Abhängigkeit von der Art der Probe - wie beispielsweise Proben aus feinen Nadelbiopsien oder Niedrigzellkulturen können jedoch u.U. auch wesentlich höhere Volumina in Frage kommen

Ebenso können die oben genannten kationischen Verbindungen und Additive auch als Feststoff zugesetzt werden, wenn die biologische Probe selbst Flüssigkeit zur Lösung des Feststoffes enthält (wie z. B. zellhaltige Körperflüssigkeiten, Zellen in

Medium, Urin) oder Flüssigkeit, z. B. Wasser, zur Lösung des Feststoffes hinzu gegeben wird. Die Zugabe als Feststoff bietet den Vorteil, daß Feststoffe meist chemisch stabiler sind und ihre Zugabe zur Probe oft einfacher durchführbar ist.

Darüber hinaus ist insbesondere bei sehr kompakten biologischen Proben, wie beispielsweise Geweben, eine Zerkleinerung bzw. Homogenisation der Probe in der Stabilisierungslösung bzw. vor Mischung mit der Stabilisierungslösung möglich, um durch z. B. mechanische, chemische, physikalische oder enzymatische Einwirkung auf die Probe die Freisetzung der Nukleinsäuren oder einzelner Zellen bzw. Zellverbände durch Zerstörung einer kompakten Probe zu unterstützen. Eine mechanische Einwirkung kann z. B. mit einem elektrischen Messer, einer Kugelmühle oder durch Pressen durch eine Spritze geschehen, während sich geeignete Enzyme zur Einwirkung auf die Probe beispielsweise Hydrolasen, Proteasen oder Lipasen anbieten.

Daneben kann die Probe auf rein physikalischem Wege - beispielsweise mittels Ultraschall - vorbehandelt werden.

Die Vorbehandlung kann des weiteren auf chemischen Wege - entweder allein oder in Kombination mit rein physikalischen Methoden - erfolgen. Als Mittel zur Unterstützung der Lyse können z. B. aliphatische Alkohole - insbesondere Isopropanol - oder Aldehyde bzw. Dialdehyde - wie z. B. Glyoxal - oder auch Phenole oder Phenolderivate - wie z. B. 2-Biphenylol oder ionische, zwitterionische und nicht-ionische Verbindungen, - wie z. B. Sulfhydryl - oder reduzierende Reagenzien - wie z. B. Dithiothreitol und β -Mercaptoethanol - oder Phosphorsäurederivate - wie z. B. Tributylphosphat - oder aber chaotrope Reagenzien, wie z. B. Harnstoff, Guanidinium-thiocyanat oder Guanidiniumhydrochlorid - oder Salze einzeln oder in Kombination verwendet werden.

Weitere Möglichkeiten zur mechanischen, chemischen, physikalischen oder enzymatischen Einwirkung auf Proben sind dem Fachmann bekannt und sollen hier umfaßt sein.

Die Lagerung des Probenmaterials kann - den jeweiligen Bedürfnissen folgend - über längere Zeiträume, wie z. B. von 1 bis zu 14 Tage oder länger, bei Raumtemperatur aber auch bei erhöhten Temperaturen, wie z. B. 40°C oder mehr, und auch bei erniedrigten Temperaturen wie z. B. 4°C oder -20°C oder weniger erfolgen.

Im Anschluß an die Lagerung der biologischen Probe in der Lösung der o. g. Verbindungen können entweder direkt Nukleinsäure-Analysetechniken angeschlossen werden, oder es kann eine Aufreinigung der Nukleinsäuren aus der Probe stattfinden.

Zum technologischen Hintergrund der Erfindung:

Die Untersuchung von RNA-Expressionsmustern bei Mikroorganismen mittels molekularbiologischer Methoden wie z. B. quantitative RT-PCR, NASBA, bDNA-Technologie oder Biochips und Northern Blotting findet Anwendung in der Grundlagenforschung bei der Analyse von Genexpressionen bei Procaryonten, sowie bei Protozoen, Pilzen und Algen und erlangt zudem wachsende Bedeutung beispielsweise in der medizinischen Diagnostik bei der Identifizierung von mikrobiellen Krankheitserregern, in der pharmazeutischen Industrie bei der Entwicklung und Evaluierung von Arzneimitteln, in der Biotechnologie bei der Herstellung rekombinanter Proteine für Forschung und therapeutische Anwendungen, in der Ökologie und Populations-Biologie oder auch in der Lebensmittelanalytik beim Nachweis von Verseuchungen mit Mikroorganismen.

Dabei besteht die Schwierigkeit, daß die Organismen zur Isolierung der Nukleinsäuren aus ihrer natürlichen Umgebung zur Gewinnung der zu untersuchenden Zellen entfernt werden und zum Ort der Isolierung der Nukleinsäuren transportiert werden müssen. Dabei besteht die große Gefahr, daß

sich die RNA-Profile, aber auch die DNA verändern. Dies würde zu falschen Diagnosen bzw. Analysen z. B. von Genexpressionen in Bakterienkulturen oder z.

B. auch in der medizinischen/klinischen Diagnostik bei der auf der Analyse von Nukleinsäuren basierenden Untersuchung von infiziertem Patientenmaterial (z. B. Proben aus Entzündungsherden) oder auch von mit Bakterien, Pilzen, Protozoen oder Algen verseuchten Lebensmitteln führen. In Lebensmittelproben oder klinischen Proben aus Patienten können die Mikroorganismen sogar absterben und somit die Nukleinsäuren, besonders die RNA vollständig abgebaut werden. Daher ist es von größter Bedeutung, daß die Nukleinsäuren, besonders die RNA unmittelbar bei der Entnahme der Probe stabilisiert werden.

Eine Besonderheit der Bakterien liegt in der extrem schnellen Anpassung ihrer Genexpression an die Milieubedingungen. Die daraus resultierenden kurzfristigen Änderungen der Genexpressionsmuster sind möglich aufgrund sehr kurzer Halbwertszeiten der zellulären mRNAs in Bakterien sowie deren Fähigkeit innerhalb weniger Sekunden oder Minuten neue RNA-Transkripte zu synthetisieren. Diese Anpassungsmechanismen stellen bei der Analyse prokaryontischer RNA-Expressionsmuster eine Schwierigkeit dar, da bereits während der Ernte der Zellen und der Prozedur der RNA-Präparation eine Veränderung der RNA-Expressionsmuster auftreten kann. Somit würde in nachfolgenden Analysen nicht mehr das Expressionsmuster unter den definierten experimentellen Kulturbedingungen betrachtet, sondern ein RNA-Expressionsmuster, welches die Bedingungen während der Ernte, der Lyse oder der nachfolgenden Aufarbeitung der Zell-Lysate widerspiegelt.

Daneben läßt sich die Lehre der vorliegenden Erfindung auch auf andere RNA-Species als mRNA, wie z. B. rRNA, snRNA, tRNA, Low Molecular Weight (LMW) RNA-Species aber auch auf DNA, wie z. B. genomische DNA (gDNA) anwenden.

Klassische Methoden zur RNA-Isolierung aus Mikroorganismen - wie Prokaryonten, Pilzen, Protozoen oder Algen- basieren z. B. auf dem Einsatz organischer Lösungsmittel wie Phenol und Chloroform(Trichlormethan), auf Verwendung chaotroper Salze oder aus Kombinationen dieser Substanzen. Bei allen bisher bekannten Methoden zur Nukleinsäure-Isolierung aus Prokaryonten, Pilzen,

Protozoen oder Algen müssen die Zellen zunächst durch Zentrifugation oder Filtration aus dem Kulturmedium angereichert werden, bevor die weitere Aufarbeitung erfolgen kann. Während dieses ersten Arbeitsschrittes kommt es in sehr zahlreichen Fällen in den Zellen aufgrund der veränderten Milieubedingungen (z.B. Temperaturänderung, mechanische Belastung durch Zentrifugation bzw. Filtration, veränderte Gasatmosphäre etc.) zu einer Änderung des Genexpressionsmusters, so daß das Genexpressionsmuster der Zellen nicht die definierten Kulturbedingungen widerspiegelt, sondern die Bedingungen der Prozedur der Nukleinsäureisolierung reflektiert. Somit wird die Validität nachfolgender Analysen fraglich.

Für die Veränderung des Expressionsmusters sind in erster Linie der unspezifische Abbau der RNA durch RNasen oder durch chemische Einflüsse – wie Deprotonierung – oder der sequenzspezifische RNA-Abbau - durch RNasen, die spezielle Sequenzen abbauen -, verantwortlich. Daneben hat die Neusynthese von RNA ebenfalls einen nachteiligen und deshalb unerwünschten Einfluß.

Häufig wird versucht, diesen Einfluß durch eine sehr schnelle Zellernte und einen schnellen Zellaufschluß zu minimieren, jedoch ist es auf diesem Weg nicht möglich, die Veränderung des Genexpressionsmusters komplett zu unterbinden. Weiterhin wird somit die gleichzeitige Aufarbeitung größerer Probenzahlen unmöglich. Zudem wurde ein enzymatischer Zellaufschluß häufig vermieden, weil dieser nur vor der Zugabe organischer Lösungsmittel oder konzentrierter chaotroper Salzlösungen möglich war, und mindestens 3 Minuten Zeit beansprucht. Somit wäre während eines enzymatischen Zellaufschlusses gleichzeitig eine enzymatische RNA-Degradierung sowie eine RNA-Neusynthese möglich, wodurch das Genexpressionsmuster der Zellen verändert worden wäre. Aus diesem Grund war es für nachfolgende Genexpressionsanalysen stets nachteilig, einen enzymatischen Zellaufschluß durchzuführen.

Eine weitere Schwierigkeit bei der Nukleinsäure-Isolierung (RNA und DNA) aus Prokaryonten, Pilzen, Algen und auch Protozoen besteht in der Lyse der Zellen, da

hierzu die Zellwand aufgeschlossen werden muß. Eine verbreitete Methode besteht z. B. im Verdau des Mureins in der prokaryontischen Zellwand mit dem Enzym

Lysozym; alternativ können jedoch auch andere Enzyme eingesetzt werden wie z.B. Lysostaphin oder Proteinasen. Während des Verdaus müssen in der zu bearbeitenden Probe Bedingungen vorliegen, die die enzymatische Aktivität des entsprechenden Enzyms gewährleisten. Gleichzeitig erlauben solche Bedingungen meist aber auch eine Spaltung der bakteriellen mRNA durch RNasen oder die chemische Hydrolyse der Nukleinsäuren, so daß häufig degradierte Nukleinsäuren aus den entsprechenden Präparationen resultieren. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, daß während dieses enzymatischen Aufschlusses der Zellen die Synthese von Nukleinsäuren stattfindet, wodurch zusätzlich das RNA-Expressionsmuster verändert würde.

Zur Aufgabe der vorliegenden Erfindung:

Die allgemeine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, die geschilderten und aus dem Stand der Technik bekannten Nachteile zu vermeiden.

Der vorliegenden Erfindung liegt demgemäß die Aufgabe zugrunde, bei der Nukleinsäure-Isolierung aus Mikroorganismen wie Bakterien, Pilzen – wie z.B. Hefen -, Protozoen oder Algen eine aufarbeitungsbedingte Änderung des Genexpressionsmusters zu vermeiden, so daß das Genexpressionsmuster der Zellen die definierten Kulturbedingungen oder die Bedingungen in der ursprünglichen Probe, wie z. B. einer Patienten- oder Lebensmittelprobe, widerspiegelt, nicht die durch die Bedingungen der Zellernte bzw. der Prozedur der Nukleinsäureisolierung hervorgerufenen Veränderungen, um somit die Validität der ggf. nachfolgenden Analysen zu sichern.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, die zeitlich parallele Aufarbeitung größerer Probenzahlen zur Isolierung von RNA und DNA zu ermöglichen.

Der vorliegenden Erfindung liegt daneben die Aufgabe zugrunde, eine Komposition in Form einer Stabilisierungslösung bereit zu stellen, deren Bestandteile nicht gesundheitsschädlich sind und damit z. B. auch für eine Stabilisierung von RNA

und/oder DNA in biologischem Probenmaterial während des Transportes vom Ort der Entnahme zu einem Labor ohne Gesundheitsgefahren – wie sie z.B. bei der Verwendung von Phenol erwachsen - für das mit der Probenbearbeitung befaßte Personal eingesetzt werden kann.

Die Lehre der vorliegenden Erfindung ist unter den Prokaryonten – neben den Archaeobakterien (wie z.B. *Methanothermobacter marburgensis*) – insbesondere auf die Eubakterien anwendbar. Unter die Eubakterien fallen Gram-positive wie auch Gram-negative Bakterien, wie auch Phototrophe Bakterien bzw. Chlamydien, Mycoplasma (wie z.B. *Mycoplasma penetrans*), Rickettsien, Spirillen und Spirochaeten (wie z. B. *Borrelia burgdorferi*), auf die sich die erfindungsgemäße Lehre anwenden läßt.

Unter den Gram-positiven Eubakterien sind insbesondere Bacillus (wie z.B. *Bacillus subtilis*), Staphylococcus (wie zum Beispiel *Staphylococcus aureus* oder *Staphylococcus epidermis*), Streptomyces (wie zum Beispiel *Streptomyces coelicolor* oder *Streptomyces lividans*), Flavobakterium (wie zum Beispiel *Flavobacterium johnsoniae*), Mycobakterium (wie zum Beispiel *Mycobakterium avium*) oder Streptococcus zu nennen.

Des weiteren ist die Lehre der vorliegenden Erfindung auf folgende Gram-positive Eubakterien anwendbar:

Clostridien (wie z. B. *C. difficile*, *C. tetani* und *C. perfringens*)

Lysteria

Peptococcus

Peptostreptococcus

Enterococcus

Corynebacterium (wie z. B. *C. diphtheriae* oder *C. glutamicum*)

Propionibakterium

Lactobacillus

Unter den Gram-negativen Eubakterien sind insbesondere Escherichia (wie zum Beispiel Escherichia coli), Pseudomonas (wie zum Beispiel Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida oder Pseudomonas syringae), Klebsiella (wie zum Beispiel Klebsiella pneumoniae), Salmonella (wie zum Beispiel Salmonella typhimurium), Sinorhizobium (wie zum Beispiel Sinorhizobium meliloti) oder Campylobacter}.

Daneben läßt sich die Lehre der vorliegenden Erfindung auf folgende Gram-negative Bakterien anwenden:

Neisseria (wie z. B. Neisseria gonorrhoeae oder N. meningitidis)

Vibrio (wie z. B. Vibrio cholerae)

Shigella

Serratia

Enterobacter

Acinetobacter

Proteus

Yersinia

Brucella (wie z. B. B. abortus)

Haemophilus (wie z. B. H. influenza)

Bacteroides

Campylobacter

Helicobacter (wie z. B. H. pylori)

Bordetella

Legionella

Pasteurella

Unter den Eukaryonten sind insbesondere zu nennen Pilze, darunter die Pilzgruppe der Dermatophyten, der Hefen, der Schimmelpilze und der biphasischen Pilze.

Unter den Hefen sind insbesondere zu nennen die Gattungen *Saccaromyces* (wie zum Beispiel *Saccaromyces cerevisiae*), *Candida* (wie z. B. *Candida albicans*), *Cryptococcus* (wie z. B. *Cryptococcus neoformans*). Unter den Schimmelpilzen sind insbesondere zu nennen die Gattungen *Aspergillus* (wie zum Beispiel *Aspergillus fumigatus*) oder *Penicillium* oder *Mucor*.

Ferner sind als Beispiele für Eucaryonten Algen und Protozoen - wie z. B. Trypanosomen, Toxoplasmen, Amöben, Plasmodien, Flagellaten - zu nennen, auf die sich die Lehre der Erfindung anwendbar ist.

Zur erfindungsgemäßen Lösung der Aufgabe:

Die vorgenannten Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden dadurch gelöst, daß man eine definierte Bakterien- Pilz- , Protozoen- oder Algenkultur oder eine Probe, die Bakterien und/oder Pilze und/oder Protozoen und/oder Algen enthält mit der Komposition – bzw. mit ihrer wässrigen Lösung - umfassend eine kationische Verbindung der allgemeinen Formel 1 und mindestens einem Protonendonator - in Kontakt bringt.

Zur anschließenden Zellernte und weiteren Aufarbeitung der Probe ist ein enzymatischer Verdau der Zellwand, z. B. des Mureingrundgerüsts der bakteriellen Zellwand mit Lysozym möglich, wobei die Nukleinsäuren in der Probe keiner enzymatischen oder chemischen Degradierung unterliegen bzw. keine Neusynthese von Nukleinsäuren stattfindet, so daß eine Änderung des RNA-Expressionsmusters verhindert wird.

Alternativ sind auch andere enzymatische Zellaufschlußmethoden denkbar, beispielsweise unter Einsatz von Lysostaphin, Proteinase K, oder auch ein Detergenz-vermittelter Zellaufschluß bzw. Kombinationen der genannten Aufschlußmethoden, auch mit mechanischen Aufschlußmethoden.

Dabei bietet ein enzymatischer Zellaufschluß, im Gegensatz zu mechanischen Aufschlußmethoden - wie beispielsweise durch Einsatz einer Kugelmühle oder des Zermörserns in flüssigem Stickstoff -, prinzipiell den Vorteil, relativ gut automatisierbar zu sein. Des weiteren erlaubt ein enzymatischer Zellaufschluß einen hohen Probendurchsatz und minimiert im Vergleich zu den aus dem Stand der Technik ebenfalls bekannten mechanischen Zellaufschluß-Methoden die Gefahr von Kreuzkontaminationen.

Neben dem enzymatischen Zellaufschluß von Bakterien bietet sich daneben auch der Zellaufschluß von Hefe-Zellen mit Hilfe von Zymolase oder Lyticase, oder auch ein anderer Aufschluß eukaryontischer Zellen mit Proteinase oder anderen

Enzymen bzw. mit Hilfe von Detergenzien nach Stabilisierung der Zellen mit den erfindungsgemäßen Kompositionen an.

Obwohl aus den angeführten Gründen prinzipiell ein enzymatischer Zellaufschluß vorteilhaft ist, wird dieses Verfahren für Analysen von Genexpressionsmustern kaum angewendet, da während dieses Arbeitsschritts bei der Durchführung herkömmlicher Präparationsmethoden eine Änderung des RNA-Expressionsmusters gerechnet werden muß. Die Anwendung des hier beschriebenen Verfahrens bietet eine Möglichkeit zur Lösung dieses Problems, indem die RNA in den Zellen bereits vor der Zellernte stabilisiert wird. In einem nachfolgenden Arbeitsschritt ist ein enzymatischer Zellaufschluß möglich, wobei eine enzymatische oder chemische Degradierung der RNA sowie eine Neusynthese unterbunden wird.

Alternativ zu einem enzymatischen Zellaufschluß kann auch ein mechanischer, thermischer oder chemischer Zellaufschluß erfolgen, sowie Kombinationen aus einem oder mehreren der genannten Aufschlußmethoden.

Nach der Stabilisierung und dem Zellaufschluß können zur weiteren Aufarbeitung der Probe die aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren auf Basis modifizierter Silica-Materialien eingesetzt werden.

Durch die vorliegende Erfindung wird eine Möglichkeit zur weiteren Aufarbeitung der Probe - beispielsweise in einer RNA-Isolierung mit Hilfe organischer Lösungsmittel, chaotroper Salze oder durch Aussalzen der Nukleinsäuren oder durch Einsatz magnetischer Partikel oder über Hybrid-Capture-Verfahren – eröffnet.

Im Vergleich zu bisherigen aus dem Stand der Technik bekannten RNA-Extraktionsmethoden - wie TRIzol oder RNeasy - wird durch den Einsatz der erfindungsgemäßen Komposition aus einem kationischem Detergenz der allgemeinen Formel I und einem Protonendonator – in Form eines Additivs, bevorzugt in Form einer aliphatischen Carbonsäure, besonders bevorzugt einer Dicarbonsäure, worunter Weinsäure ganz besonders bevorzugt wird - eine Ausbeute erzielt, welche derjenigen der o.a. herkömmlichen Methoden beispielsweise um das 2- bis 3-fache übersteigt.

Diese hohe RNA-Ausbeute ist insbesondere vorteilhaft bei der Analyse niedrig exprimierter RNA-Transkripte oder solcher RNA-Transkripte, die nur von einer Subgruppe einer zu analysierenden Bakterienpopulation exprimiert werden. Zudem gibt es bisher keine praktikable Methode zur mRNA-Isolierung aus Bakterien, so daß man bei der Analyse bakterieller mRNAs mit einem starken Hintergrund anderer RNA-Species (rRNA, tRNA, snRNPs) arbeitet. Bei derartigen Fragestellungen ist von einer Steigerung der Sensitivität der analytischen Verfahren aufgrund der gesteigerten Ausbeute auszugehen.

Die Vorteile der Erfindung liegen insbesondere bei allen Anwendungen, in denen Analysen von Genexpressionsmustern in Mikroorganismen (Procaryonten, Protozoen, Pilzen, Algen) durchgeführt werden sollen. Dieses umfaßt beispielsweise wissenschaftliche Fragestellungen, die zum basalen Verständnis der Regulation der prokaryontischer Genexpression beitragen, als auch Studien, in denen beispielsweise die Beziehung zwischen der Expression ausgewählter Gene und der Pathogenität von Bakterien analysiert wird. Letzterer Fragestellung ist insbesondere in der Diagnostik und zur Behandlung bakterieller Infektionen relevant.

Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet der Erfindung liegt in der Genexpressionsanalyse von Prokaryonten, Protozoen und Pilzen in der pharmazeutischen Forschung und Entwicklung. Die Stabilisierung z. B. prokaryontischer RNA-Expressionsmuster vereinfacht erheblich die Analyse von Transkriptspiegeln oder kompletter Expressionsmuster etwa im Rahmen von Experimenten, in denen die Zeitabhängigkeit der Genexpression dargestellt werden soll. Weiterhin wird die Identifizierung und Quantifizierung von Spezies in komplexen Populationen, beispielsweise von Bakterien in einer Bodenprobe oder von Krankheitserregern in Proben von Patienten erheblich erleichtert. Darüber hinaus erstreckt sich das Anwendungspotential auch auf weitere analytische Bereiche wie z.B. auf die Lebensmittelanalytik.

Durch die Stabilisierung von Nukleinsäuren mit Hilfe der erfindungsgemäßen Komposition aus einer oder mehreren kationischen Verbindung(en) und einem oder mehreren Additiv(en) wird erreicht, daß die Nukleinsäuren in einer Probe auch bei längerer Lagerung oder während eines Transports sich nicht verändern. Somit wird die Genauigkeit später durchgeführter Tests deutlich erhöht. In bestimmten Fällen, wenn z. B. das Probenmaterial über weite Strecken transportiert oder länger gelagert werden muß - macht das erfindungsgemäße Verfahren diese Tests nach einem derartigen Zeitraum überhaupt erst möglich.

Die Vorteile dieser Erfindung liegen insbesondere sowohl im Bereich der Forschung, z. B. für die Analyse von Transkriptspiegeln, die direkt nach der Entnahme fixiert werden müssen, als auch im Bereich klinischer Analysen - wie z. B. molekulare Diagnostik -, wo Patientenproben nach der Entnahme während Lagerung und Transport bis zur Analyse ebenfalls stabilisiert werden müssen.

Daneben findet die Isolierung und Stabilisierung von Nukleinsäuren Anwendung in der Tumordiagnostik, in der Diagnostik erblich bedingter Krankheiten sowie in der Virusdiagnostik und dem Virus-Monitoring und der Diagnose und dem Monitoring anderer infektiöser Erreger, sowie in der Analyse von Genexpressionsmustern.

Erläuterung der Figuren:

Fig. 1 zeigt in graphischer Darstellung die Abhängigkeit der RNA-Ausbeute vom pH-Wert der Detergenz-Lösung und vom Volumenverhältnis zwischen Kultur und Detergenz-Lösung.

Fig. 2 zeigt in graphischer Darstellung die Abhängigkeit der RNA-Ausbeute der verschiedenen Protokoll-Varianten.

Fig. 3 zeigt in graphischer Darstellung die RNA-Ausbeute in Abhängigkeit vom Volumen der wässrigen Lösung der erfindungsgemäßen Verbindung.

Fig. 4 zeigt das Ergebnis der denaturierenden Agarose-Gelelektrophorese und ompA Northern Blot Analyse von *E. coli* RNA isoliert mit Lösungen verschiedener Volumina von Lösungen der Komposition aus kationischer Verbindung und Protonendonator in verschiedenen Konzentrationen.

Fig. 5 zeigt die ompA („outer membrane protein A“) Northern Blot Analyse von *E. coli* RNA isoliert nach Rifampicin-Zugabe mit bzw. ohne Lösung der erfindungsgemäßen Komposition.

Fig. 6 zeigt die bla (β -lactamase) Northern Blot Analyse von *E. coli* RNA isoliert nach Rifampicin-Zugabe mit bzw. ohne Verwendung der Komposition aus kationischer Verbindung und Additiv bzw. deren wässriger Lösung.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die vorliegende Erfindung erläutern:

Beispiel 1

RNA-Isolierung aus *E. coli*

Eine wässrige Lösung bestehend aus 4% (w/v)

Tetradecyltrimethylammoniumoxalat

200mM Weinsäure wird mit Natronlauge auf folgende pH-Werte eingestellt:

2,2 (ohne Zugabe von NaOH); 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 und 5,0.

25.

Zur Versuchsdurchführung werden pro Ansatz zu 400µl einer Kultur von *E. coli* in LB-Medium je 2; 3 bzw. 4 Volumen der Detergenz-Lösung der verschiedenen pH-Werte zupipettiert, und die RNA-Isolierung nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Zugabe von 400µl der *E. coli* Kultur zur vorgelegten Detergenz-Lösung, vortexen
- Zentrifugation 5000 x g 10min bei 4°C
- Überstand dekantieren
- Pellet in 1ml H₂O resuspendieren
- Zentrifugation 5000 x g 10 min bei 4°C
- Überstand dekantieren
- Pellet in 100µl TE-Puffer¹⁾ mit 400µg/ml Lysozym resuspendieren
- Inkubation 5min bei Raumtemperatur
- Zugabe von 300µl RLT-Puffer²⁾ vortexen
- Zugabe von 260µl H₂O, vortexen
- Zugabe von 40µl Proteinase K (18mg/ml), vortexen
- Inkubation 10min 55°C
- Zentrifugation 3min 14000 xg

¹⁾TE Puffer besteht aus 10 mM Tris-HCl und 1 mM EDTA, der bei einem pH-Wert von 8 puffert.

²⁾Unter RLT-Puffer ist ein handelsüblicher Puffer (erhältlich von der Fa. QIAGEN, Hilden) auf der Basis eines Guanidiniumsalzes – wie z.B. Guanidinium-isothiocyanat – und eines Alkalisalzes einer mehrbasischen organischen Säure sowie β-Mercaptoethanol zu verstehen, der bei pH 7 puffert.

-Überstand abnehmen, Zugabe von 350µl 100% Ethanol, vortexen-Laden der Lösung auf RNeasy Mini spin column

-weitere Aufarbeitung wie aus dem Stand der Technik bekannt – z.B. wie im RNeasy® Mini Protokoll der Fa. QIAGEN, Hilden zur Isolierung von total RNA aus Bakterien ab Schritt 5 beschrieben.

Fig. 1 zeigt die RNA-Ausbeute in Abhängigkeit vom pH-Wert der Detergenz-Lösung und vom Volumenverhältnis zwischen Kultur und Detergens-Lösung

Die erhaltenen Resultate zeigen außerdem, daß sich die höchsten Ausbeuten an RNA dann erzielen lassen, wenn die wässrige Lösung der erfindungsgemäßen Komposition einen pH-Wert in einem Intervall von 3,5 bis 5,0 aufweist.

Die Intaktheit der RNA wird per Agarose-Gelelektrophorese analysiert. In allen Fällen werden intakte ribosomale RNA Banden gefunden.

Beispiel 2

RNA-Isolierung aus *E. coli* mit verschiedenen Protokollvarianten

Ausgangsmaterial für die unter diesem Beispiel zusammengefaßten Experimente ist wiederum eine in LB-Medium angezogene *E. coli* Kultur. Alle verschiedenen Protokoll-Varianten werden unter Einsatz von je $1,5 \times 10^8$ sowie 3×10^8 Zellen durchgeführt. Für diese Versuchs-Reihe wird eine wässrige Lösung der erfindungsgemäßen Komposition mit folgender Zusammensetzung eingesetzt:

4% (w/v) Tetradecyl-trimethyl-ammoniumoxalat
200mM Weinsäure
mit einem pH-wert von 4,0

Ausgehend von folgenden Partialschritten des RNA-Isolierungs-Protokolls werden verschiedene Protokoll-Varianten erstellt:

1) Zellernte

Zugabe von 3 Volumen Detergenz-Lösung zur *E. coli* Kultur, vortexen,
Zentrifugation, 5000 x g 10 min bei 4°C, Überstand dekantieren

2) Waschen des Pellets

Pellet in 1ml H₂O resuspendieren, Zentrifugation 5000 x g 10min bei 4°C,
Überstand dekantieren

3) Lysozym-Verdau

Pellet in 100µl TE-Puffer mit 400µg/ml Lysozym resuspendieren, Inkubation 5min
bei Raumtemperatur

4) Bindebedingungen einstellen

Zugabe von 350µl RLT-Puffer, vortexen, Zugabe von 250µl 100% Ethanol

5) Proteinase K Verdau

Zugabe von 300µl RLT-Puffer, vortexen, Zugabe von 260µl H₂O, Zugabe von 40µl
Proteinase K (18mg/ml), vortexen, Inkubation 10min 55°C, Zentrifugation 3min
14000 x g, Überstand abnehmen, Zugabe von 350µl 100% Ethanol, vortexen

6) Lysozym-Verdau und Proteinase K Verdau in verdünntem RLT-Puffer

Zugabe von 300µl RLTPuffer, vortexen, Zugabe von 160µl H₂O, vortexen, Zugabe
von 100µl TE-Puffer mit 400µg/ml Lysozym, Inkubation 5 min bei Raumtemperatur,
Zugabe von 40µl Proteinase K (18mg/ml), vortexen, Inkubation 10 min 55°C,
Zentrifugation 3 min 14000 xg, Überstand abnehmen, Zugabe von 350µl 100%
Ethanol, vortexen

7) Aufarbeitung mittels einer ggf. modifizierten Silicasäule - wie z.B. mit der
RNeasy Mini spin column (erhältlich von der Firma QIAGEN, Hilden)

Laden der Lösung auf die Säule, weitere Aufarbeitung lt. RNeasy Mini Protokoll zur
Isolierung von total RNA aus Bakterien, Schritt 5

Das Ausgangsprotokoll wird mit folgenden Protokoll-Varianten verglichen:

Variante 1: Schritte 1); 3); 4) und 7)

Variante 2: Schritte 1); 2); 3); 4) und 7)

Variante 3: Schritte 1); 2), 3); 5) und 7) (Ausgangsprotokoll wie unter Beispiel1)

Variante 4: Schritte 1); 6) und 7)

Fig. 2 zeigt die RNA-Ausbeute der verschiedenen Protokoll-Varianten

Die Ergebnisse dieser Experimente liefern einen deutlichen Hinweis dafür, daß die Durchführung der Protokoll-Variante 1 bezüglich der RNA-Ausbeute vergleichbar ist mit dem Ausgangsprotokoll (Variante 3). In dieser Protokoll-Variante wird auf einen Waschschrift sowie auf den Proteinase K Verdau verzichtet. Insgesamt wird somit die Aufarbeitungs-Prozedur wesentlich verkürzt, so daß diese Protokoll-Variante in folgenden Beispielen als Standardmethode eingesetzt wird.

Beispiel 3

RNA-Isolierung aus E. coli mit verschiedenen Volumenverhältnissen von Kultur und wässriger Lösung der erfindungsgemäßen Komposition

Es werden wässrige Lösungen der erfindungsgemäßen Komposition mit folgender Zusammensetzungen verwendet:

Lösung QCX 1	4% (w/v) Tetradecyltrimethylammoniumoxalat 200mM Weinsäure pH 4,0
Lösung QCX 2	6% (w/v) Tetradecyltrimethylammoniumoxalat 300mM Weinsäure pH 4,0

Lösung QCX 3	8% (w/v) Tetradecyltrimethylammoniumoxalat 400mM Weinsäure pH 4,0
Lösung QCX 4	15% (w/v) Tetradecyltrimethylammoniumoxalat 750mM Weinsäure pH 4,0

Jeweils 400µl einer in LB-Medium (10g Trypton; 5g Hefeextrakt; 10g NaCl; H₂O ad 1000ml) gewachsenen *E. coli* Kultur werden mit 2; 3 bzw. 4 Volumina der jeweiligen Lösungen versetzt, und nach dem in Beispiel 2 definierten Standardprotokoll aufgearbeitet.

Fig. 3 zeigt die RNA-Ausbeute in Abhängigkeit vom Volumen der wässrigen Lösung der kationischen Verbindung gemäß Formel 1 und Additiv.

Wie aus den experimentellen Befunden hervorgeht, sind die RNA-Ausbeuten bei Einsatz von 2 bzw. 3 Volumina der verschiedenen Detergenz-Lösungen durchaus vergleichbar. Bei Einsatz von 4 Volumen der oben beschriebenen Lösungen kommt es zu einem gewissen Verlust an RNA-Ausbeute. Innerhalb der Ansätze unter Einsatz von 2 bzw. 3 Volumina der Detergenz-Lösung werden mit den Lösungen 1; 2 und 3 vergleichbar hohe Ausbeuten erzielt.

Um die Intaktheit der isolierten RNA beurteilen zu können, wird die RNA auf denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt und anschließend eine Northern Blot Analyse durchgeführt (vgl. Fig. 4!).

Die visuelle Analyse der rRNA-Banden zeigt größtenteils intakte ribosomale RNA-Banden auf dem Agarosegel. Lediglich die bei Verwendung von Lösung 4 erhaltenen Banden deuten auf eine teilweise Degradierung der RNA. Dieser Befund

wird durch eine Northern Blot Analyse gesichert, bei der mit einer gegen die ompA („outer membrane protein A“) mRNA aus *E. coli* gerichtete Sonde hybridisiert wird.

*Bei der ompA mRNA handelt es sich mit einer Halbwertszeit von 15 min um ein relativ langlebiges RNA-Transkript (Nature 1984, 312: 75 – 77).

Wieder zeigt sich eine Degradierung der RNA, die mit Hilfe der Lösung 4 isoliert wird. Bei Vergleich der übrigen RNA-Proben zeigen sich die schärfsten ompA mRNA-Banden in den Spuren, in denen RNA mit der Lösung 1 isoliert wird. Insgesamt weisen die RNA-Proben, die mit den Lösungen 1 - 3 isoliert worden sind, jedoch nur sehr geringe Unterschiede bezüglich der RNA Qualität auf.

Fig. 4 gibt das Ergebnis der denaturierenden Agarose-Gelelektrophorese und ompA Northern Blot Analyse von *E. coli* RNA isoliert mit Lösungen verschiedener Volumina und Konzentrationen wieder.

Beispiel 4

Stabilisierung von *E. coli* RNA

Zur Beurteilung der Stabilisierungseffizienz werden in diesem Beispiel Experimente durchgeführt, in denen den *E. coli* Zellen im Kulturmedium der RNA-Polymerase-Inhibitor Rifampicin zugegeben wird (FEBS Letters 1998, 440: 172 – 174). Damit wird die Neusynthese von RNA-Transkripten verhindert, wodurch die Analyse der Degradierung von RNA-Transkripten erleichtert wird. Zu definierten Zeitpunkten nach Zugabe des Inhibitors erfolgt die RNA-Isolierung aus den Zellen. Als Kontrollen dienen Ansätze, mit denen analog verfahren wird, jedoch die RNA ohne Zusatz der Lösung isoliert wird (RNeasy Standard-Protokoll). Zur Beurteilung der Intaktheit der mRNA werden nach der RNA-Isolierung Northern Blot Experimente durchgeführt.

Fig. 5 zeigt die ompA („outer membrane protein A“) Northern Blot Analyse von *E. coli* RNA isoliert nach Rifampicin-Zugabe mit bzw. ohne Lösung der erfindungsgemäßen Komposition.

Bei der ompA mRNA handelt es sich um ein *E. coli* Transkript, daß unter den gewählten Kulturbedingungen eine Halbwertszeit von 15 Minuten aufweist (Nature 1984, 312: 75 – 77). Die Northern Blot Analyse (Fig. 5) zeigt, daß in den Proben, die mit der erfindungsgemäßen Lösung behandelt werden, über den gesamten untersuchten Zeitraum (bis zu 15 Minuten) ein gleichmäßig intensives Signal für die ompA mRNA zu detektieren ist. Im Gegensatz dazu ist für die ompA mRNA in den Proben ohne Zusatz des Detergenz bereits nach 0 bis 5 Minuten ein deutlicher Verlust des Transkripts zu verzeichnen.

Fig. 6 zeigt die bla (β -lactamase) Northern Blot Analyse von *E. coli* RNA isoliert nach Rifampicin-Zugabe mit bzw. ohne Verwendung der Komposition bzw. der wässriger Lösung aus kationischer Verbindung und Additiv.

Bei einer Northern Blot Analyse für die β -lactamase mRNA (bla) ist derselbe Effekt noch deutlicher nachzuweisen. Dieses mRNA Transkript besitzt unter den gewählten Kulturbedingungen eine Halbwertszeit von 2-5 Minuten (Nature 1984, 312: 75 – 77). Wie aus Fig. 6 ersichtlich ist, ist dieses Transkript mit vergleichbarer Signalintensität über den gesamten untersuchten Zeitraum in den RNA-Proben nachzuweisen, die unter Zusatz der Lösung isoliert werden. In den Kontrollansätzen ohne die Detergenz-Lösung ist dagegen bereits bei sofortiger Aufarbeitung der RNA (0 Minuten) ein fast vollständiger Verlust des bla mRNA Transkripts zu verzeichnen. Die Differenz der bla mRNA Signalintensitäten zwischen den beiden RNA-Isolierungsmethoden reflektiert die unmittelbare Stabilisierung der mRNA durch die entsprechende wässrige Lösung der erfindungsgemäßen Komposition.

Diese Experimente belegen, daß mit der erfindungsgemäßen Komposition die Möglichkeit eröffnet wird, RNA-Expressionsprofile von Bakterien im Zustand der Flüssigkultur zu fixieren, ohne daß dabei Artefakte aus der Isolierungsprozedur zu einer Verzerrung des Expressionsmusters führen.

Beispiel 5

RNA-Stabilisierung mit Tetradecyltrimethylammoniumbromid (TTAB)

In den folgenden Experimenten wird eine TTAB-Lösung folgender Zusammensetzung verwendet:

4% (w/v) TTAB

200mM Weinsäure

pH 4,0

Verschiedene Bakterien-Species unterscheiden sich u.a. in der Beschaffenheit ihrer Zellwand. Beim Einsatz unterschiedlicher Species ist der Zellaufschluß ein kritischer Schritt zur Isolierung von RNA. Gegenüber dem enzymatischen Zellaufschluß, der insbesondere für Gram-negative Bakterienspezies zu guten Ergebnissen führt, bietet ein mechanischer Zellaufschluß potentiell die Möglichkeit, verschiedenste Species aufzuschließen.

Die nachfolgende Tabelle zeigt einen Vergleich der verschiedenen Ausbeuten, die zum einen nach Methoden des Standes der Technik (RNeasy unter Durchführung eines Lysozym-vermittelten Zellaufschlusses), unter Verwendung der erfindungsgemäßen Komposition und RNeasy inklusive des Lysozym-Verdaus, sowie unter Verwendung der erfindungsgemäßen Komposition und RNeasy, wobei der enzymatische Zellaufschluß durch den Einsatz der Kugelmühle unterstützt wurde. Bei der Verwendung der Kugelmühle (MM 300 der Firma QIAGEN) wurden pro Ansatz 50 mg Säure-gewaschene Glasbeads (Durchmesser 150-600 µm) verwendet. Der Zellaufschluß in der Kugelmühle erfolgte für 5 min bei maximaler Schüttelgeschwindigkeit (30 Hz).

Tab. 2

RNA-Ausbeuten aus 1×10^8 Zellen *B. subtilis* bei verschiedenen Zellaufschlußmethoden und anschließender RNA-Isolierung mit RNeasy®

Zellaufschluß	Lysozym-verdau	TTAB-Lösung + Lysozym-verdau	TTAB-Lösung + Kugelmühle + Lysozym-verdau
<i>B. subtilis</i> in LB-Medium	7 µg	15 µg	19 µg
<i>B. subtilis</i> in Mineral-Medium	3 µg	8 µg	10 µg

Wie aus dem Vergleich deutlich ersichtlich ist, führt die RNA-Isolierung mit der Lösung der erfindungsgemäßen Komposition in Kombination mit einem mechanischen Zellaufschluß zu einer ca. 25 %-igen Erhöhung der Steigerung im Vergleich zum enzymatischen Zellaufschluß unter Verwendung der Lösung (Tab. 2). Im Vergleich zur RNA-Isolierung nach RNeasy Standardprotokoll wurde durch den mechanischen Zellaufschluß unter Einsatz der Detergenz-Lösung im Schnitt eine Verdreifachung der Ausbeute erzielt.

Diese Ergebnisse offenbaren einen deutlich Hinweis, daß der enzymatische Zellaufschluß unter Einsatz der Detergenz-Lösung auch bei den Gram-positiven *B. subtilis* Zellen effizient verläuft, so daß hier optional auf einen mechanischen Zellaufschluß verzichtet werden kann.

Die Verwendung einer mechanischen Aufschlußmethode – wie der Kugelmühle – eröffnet aber zudem die Möglichkeit, unter Verzicht auf einen enzymatischen Zellaufschluß eine ca. 6-fache Ausbeutesteigerung im Vergleich zur RNA-Isolierung ohne enzymatischen oder mechanischen Zellaufschluß zu erreichen, wie der nachfolgende experimentelle Befund eindeutig belegt:

Als Ausgangsmaterial dient eine in LB-Medium gewachsene Kultur von *Bacillus subtilis*. Verglichen werden die RNA-Ausbeuten aus jeweils $1,8 \times 10^8$ Zellen pro Ansatz (Tab. 3). In einem Teil der Proben erfolgte der Zellaufschluß mit Hilfe einer Kugelmühle (MM300 der Firma QIAGEN) unter Einsatz von 50mg Säure-gewaschenen Glasbeads (Durchmesser 150-600 μm) pro Ansatz verwendet. Der Zellaufschluß in der Kugelmühle erfolgte für 5 min bei maximaler

Schüttelgeschwindigkeit (30 Hz). In einem anderen Teil der Proben wurde weder ein enzymatischer noch ein meachanischer Zellaufschluß durchgeführt wurde.

(Literaturstelle: J. Microbiol. Methods 44 (2001): 235 – 238)

Promega "SV Total RNA Isolation System"

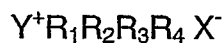
Tab. 3

RNA-Ausbeute aus *Bacillus subtilis* in Abhängigkeit von der Zell-Aufschlußmethode und der Zugabe der TTAB-Lösung

	Ohne enzymatischen oder mechanischen Zellaufschluß	Mechanischer Zellaufschluß
Verwendung der TTAB- Lösung	3 μg	18 μg

Patentansprüche

1. Verwendung einer Komposition umfassend als Bestandteile eine kationische Verbindung der allgemeinen Formel



worin

Y Stickstoff oder Phosphor

R₁, R₂, R₃ und R₄ unabhängig voneinander einen unverzweigten oder verzweigten C₁-C₂₀-Alkylrest und/oder einen C₇-C₂₀-Arylrest sowie einen C₆-C₂₆-Aralkylrest und

X⁻ ein Anion einer anorganischen oder organischen, ein- oder mehrbasischen Säure

bedeuten können

und mindestens einen Protonendonator

zur Stabilisierung und/oder Isolierung von Nukleinsäuren in bzw. aus Mikroorganismen - wie Prokaryonten, Pilzen, Protozoen oder Algen.

2. Verwendung einer Komposition nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Y Stickstoff bedeutet.
3. Verwendung einer Komposition nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet R₁ einen höheren Alkylrest mit vorzugsweise 12, 14 oder 16 Kohlenstoffatomen und R₂, R₃ und R₄ jeweils eine Methylgruppe bedeutet.

4. Verwendung einer Komposition nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Anion X^- aus der Gruppe der Anionen von Halogenwasserstoffsäuren oder Anionen ein- oder zweibasischer organischer Säuren ausgewählt wird.
5. Verwendung einer Komposition nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Anion X^- Anionen aus der Gruppe Bromid, Chlorid, Phosphat, Sulfat, Formiat, Acetat, Propionat, Oxalat, Malonat, Succinat oder Citrat ausgewählt wird.
6. Verwendung einer Komposition nach einem der Ansprüche 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, daß der Protonendonator aus der Gruppe der gesättigten aliphatischen Monocarbonsäuren, der ungesättigten Alkenyl-carbonsäuren, der gesättigten und/oder ungesättigten aliphatische C_2 - C_6 -Dicarbonsäuren und/oder Tricarbonsäuren, der aliphatischen Ketodicarbonsäuren, der Aminosäuren oder aus der Gruppe der Mineralsäuren oder deren Salze allein oder in Kombination ausgewählt wird.
7. Verwendung einer Komposition nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß als aliphatische Monocarbonsäure eine C_1 - C_6 -Alkyl-carbonsäure, vorzugsweise Essigsäure, Propionsäure, n-Buttersäure, n-Valeriansäure, Isovaleriansäure, Ethyl-methyl-essigsäure (2-Methyl-buttersäure), 2,2-Dimethylpropionsäure (Pivalinsäure), n-Hexansäure, n-Octansäure, n-Decansäure bzw. n-Dodecansäure (Laurinsäure) oder Mischungen der genannten Säuren eingesetzt werden.
8. Verwendung einer Komposition nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß als aliphatische Alkenyl-carbonsäure Acrylsäure (Propensäure), Methacrylsäure, Crotonsäure, iso-Crotonsäure oder Vinylessigsäure oder Mischungen der genannten Säuren eingesetzt werden.

9. Verwendung einer Komposition nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet als gesättigte aliphatische C₂-C₆-Dicarbonsäure eine Dicarbonsäure aus der Gruppe Oxalsäure, Malonsäure, Bersteinsäure, Glutarsäure bzw. Adipinsäure oder Mischungen der genannten Säuren eingesetzt werden.
10. Verwendung einer Komposition nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß als Protonendonoren aliphatische Dicarbonsäuren, vorzugsweise Oxalsäure oder Bersteinsäure oder Mischungen der genannten Säuren eingesetzt werden.
11. Verwendung einer Komposition nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Protonendonoren aliphatische Hydroxi-di- und -tricarbonsäuren, vorzugsweise Tartronsäure, D-(+)-, L-(-) oder DL-Äpfelsäure, (2R, 3R)-(+)-Weinsäure, (2S, 3S)-(-)-Weinsäure, meso-Weinsäure und Citronensäure oder Mischungen der genannten Säuren eingesetzt werden.
12. Verwendung einer Komposition nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Protonendonoren ungesättigte Dicarbonsäuren, vorzugsweise Malein- und/oder Fumarsäure oder Mischungen der genannten Säuren eingesetzt werden.
13. Verwendung einer Komposition nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Protonendonoren ungesättigte Tricarbonsäuren, vorzugsweise Aconitsäure, oder Mischungen dieser Säuren eingesetzt werden.
14. Verwendung einer Komposition nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Protonendonoren aliphatische Ketodicarbonsäuren, vorzugsweise Mesoxalsäure oder Oxalessigsäure, oder Mischungen der genannten Säuren eingesetzt werden.
15. Verwendung einer Komposition nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Protonendonoren Aminosäuren, vorzugsweise Aminoessigsäure (Glycin), α -Aminopropionsäure (Alanin), α -Amino-iso-valeriansäure (Valin), α -

Amino-*iso*-capronsäure (Leucin) und α -Amino- β -methylvaleriansäure (Isoleucin), oder Mischungen der genannten Säuren eingesetzt werden.

16. Verwendung einer Komposition nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Komposition in Form einer wässrigen Lösung eingesetzt wird.
17. Verwendung einer Komposition nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die kationische Verbindung in der Komposition in einer Konzentration in einem Intervall von 0.01 % (W/V) bis zur Sättigung, bevorzugt zwischen 0.1 und 10 % (W/V), besonders bevorzugt zwischen 0.5 und 8 % (W/V) und ganz besonders bevorzugt zwischen 2 und 6 % (W/V) vorliegt.
18. Verwendung einer Komposition gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17 dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren aus Prokaryonten, den Archaeobakterien (wie z.B. *Methanothermobacter marburgensis*) oder den Eubakterien stammen.
19. Verwendung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren aus Gram-positiven Bakterien stammen.
20. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren aus *Bacillus* – wie z.B. *Bacillus subtilis* –, *Staphylococcus* – wie zum Beispiel *Staphylococcus aureus* oder *Staphylococcus epidermis* –, *Streptomyces* – wie zum Beispiel *Streptomyces coelicolor* oder *Streptomyces lividans* –, *Flavobakterium* – wie zum Beispiel *Flavobakterium johnsoniae* –, *Mycobakterium* – wie zum Beispiel *Mycobakterium avium* –, *Streptococcus*, *Clostridien* – wie z. B. *C. difficile*, *C. tetani* und *C. perfringens* –, *Lysteria*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebakterium* – wie z. B. *C. diphtheriae* oder *C. glutamicum* –, *Propionibakterium* oder *Lactobacillus* stammen.

21. Verwendung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren aus Gram-negativen Bakterien stammen.
22. Verwendung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren aus Escherichia – wie zum Beispiel Escherichia coli-, Pseudomonas – wie zum Beispiel Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida oder Pseudomonas syringae-, Klebsiella – wie zum Beispiel Klebsiella pneumoniae-, Salmonella – wie zum Beispiel Salmonella typhimurium-, Sinorhizobium – wie zum Beispiel Sinorhizobium meliloti -, Campylobacter Neisseria – wie z. B. Neisseria gonorrhoeae oder N. meningitidis-, Vibrio – wie z. B. Vibrio cholerae-, Shigella, Serratia, Enterobacter, Acinetobacter, Proteus, Yersinia, Brucella – wie zum Beispiel B. abortus-, Haemophilus – wie z. B. H. influenza -, Bacteroides, Helicobacter – wie z. B. H. pylori -, Bordetella, Legionella oder Pasteurella stammen.
23. Verwendung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren aus Chlamydien stammen.
24. Verwendung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren aus phototrophen Bakterien stammen.
25. Verwendung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren aus Mycoplasma - wie z.B. Mycoplasma penetrans – stammen.
26. Verwendung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren aus Rickettsien stammen.
27. Verwendung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren aus Spirochaeten stammen.

28. Verwendung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren aus Spirillen stammen.
29. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren aus eukaryotischen Mikroorganismen stammen.
30. Verwendung nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren aus Pilzen der Gruppe der Dermatophyten, der Hefen, der Schimmelpilze und der biphasischen Pilze stammen.
31. Verwendung nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren aus den Hefen *Saccaromyces* - wie z. B. *Saccaromyces cerevisiae* -, *Candida* - wie z. B. *Candida albicans* - oder *Cryptococcus* - wie z. B. *Cryptococcus neoformans* - stammen.
32. Verwendung nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren aus Schimmelpilzen der Gruppe, *Aspergillus* - wie zum Beispiel *Aspergillus fumigatus* - stammen.
33. Verwendung nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren aus Schimmelpilzen der Gruppe *Penicillium* stammen.
34. Verwendung nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren aus Schimmelpilzen der Gruppe *Mucor* stammen.
35. Verwendung nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren aus Algen stammen.
36. Verwendung nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren aus Protozoen - wie z. B. Trypanosomen, Toxoplasmen, Amöben, Plasmodien, Flagellaten - stammen.

37. Verwendung einer Komposition gemäß einem der Ansprüche 1 bis 36, dadurch gekennzeichnet, daß ein enzymatischer, mechanischer, thermischer oder chemischer Aufschluß der Bakterien oder der Pilze oder der Protozoen oder der Algen erfolgt oder eine Kombination der Aufschlußmethoden angewendet wird.
38. Verwendung einer Komposition gemäß einem der Ansprüche 1 bis 37, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert der Komposition in einem Bereich von 2 bis 12, bevorzugt 2 bis 8 und besonders bevorzugt in einem Intervall von 2 bis 5 liegt.
39. Verfahren zur Herstellung einer der Kompositionen nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man die einzelnen Bestandteile gegebenenfalls in wässriger Lösung zusammenfügt und vermischt.
40. Diagnostische Zusammensetzung, enthaltend eine Komposition gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17.
41. Kit zur Stabilisierung von Nukleinsäuren enthaltend eine Komposition gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17.
42. Mischung enthaltend eine biologische Probe gemäß einem der Ansprüche 18 bis 36 und eine Komposition nach einem der Ansprüche 1 bis 17 gegebenenfalls neben weiteren Hilfsstoffen.

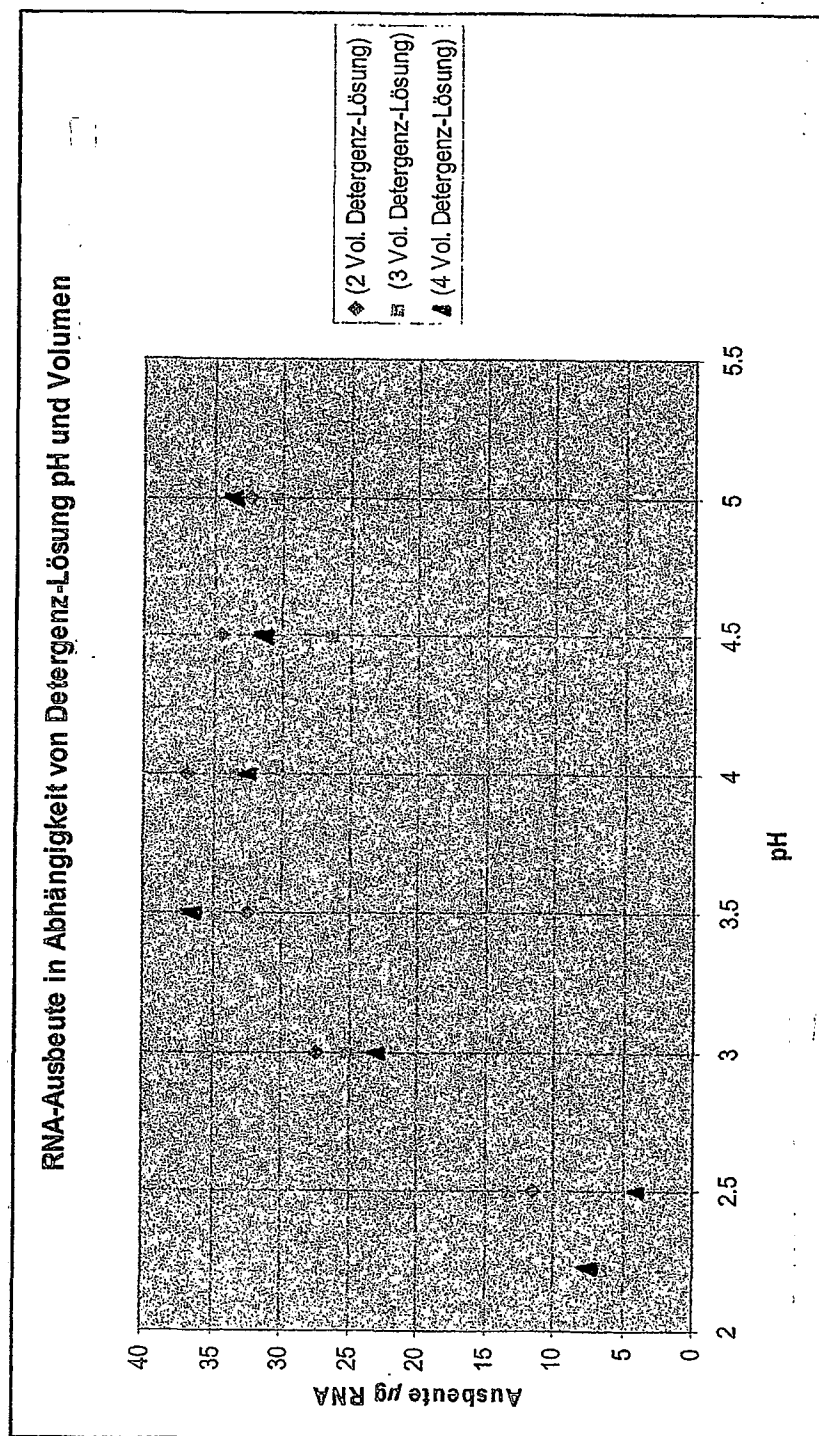


Fig. 1

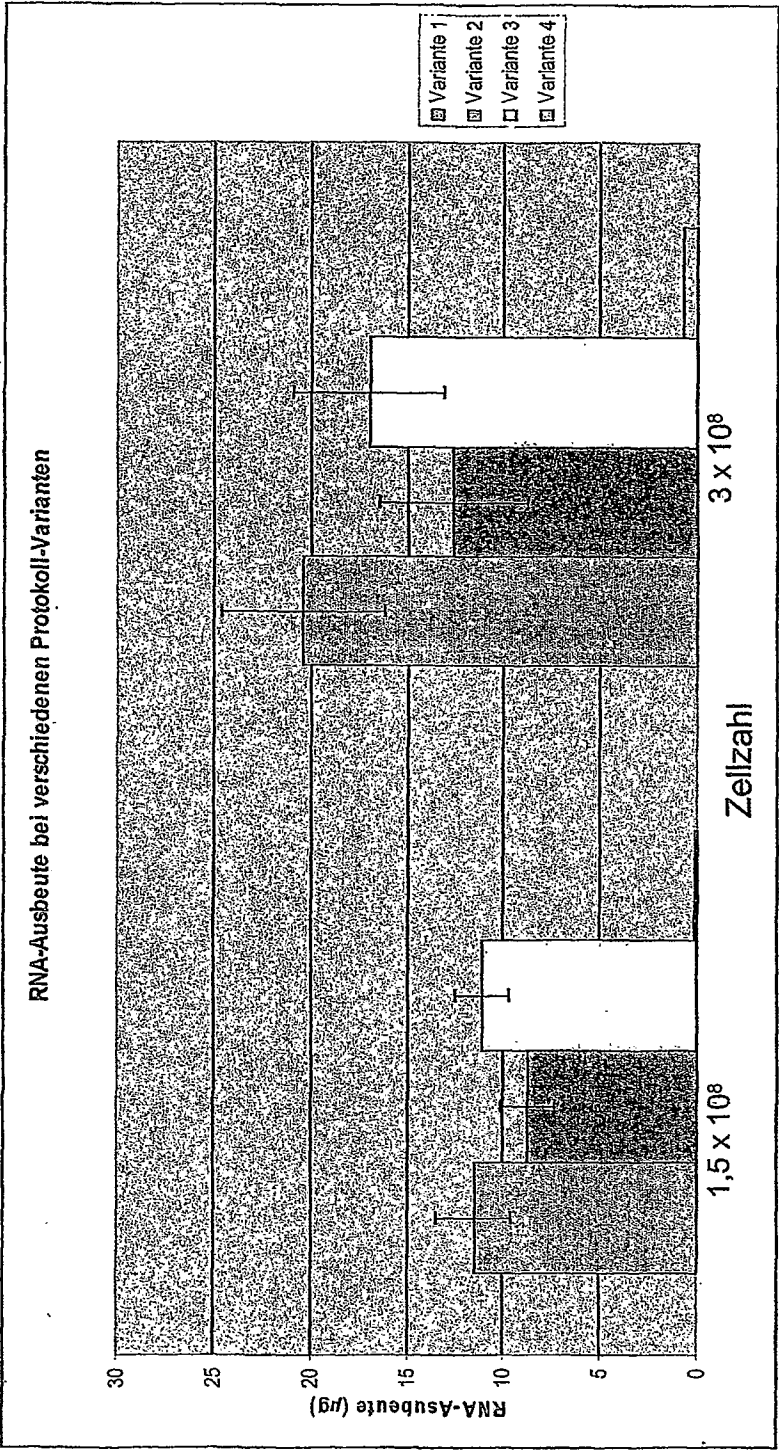


Fig. 2

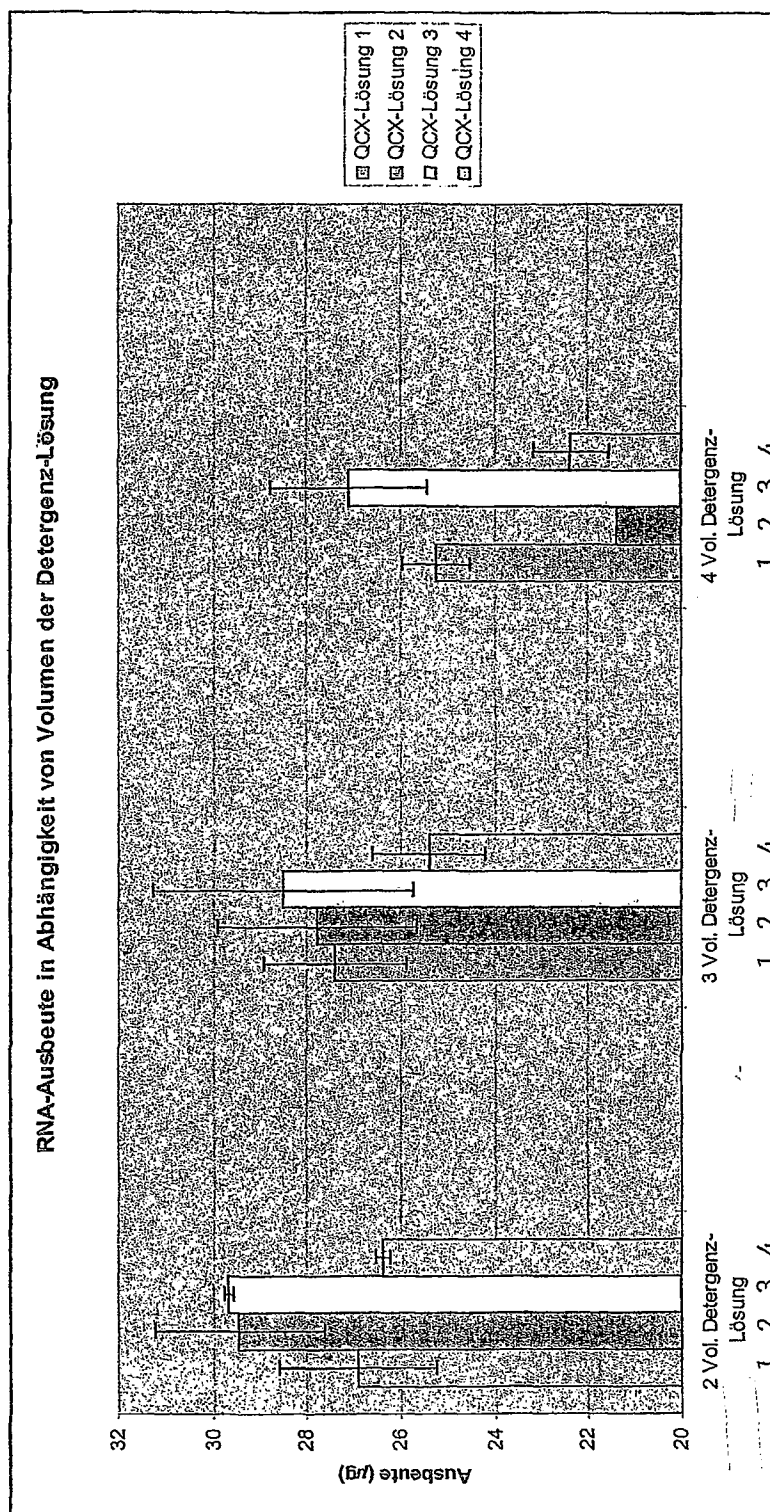


Fig. 3

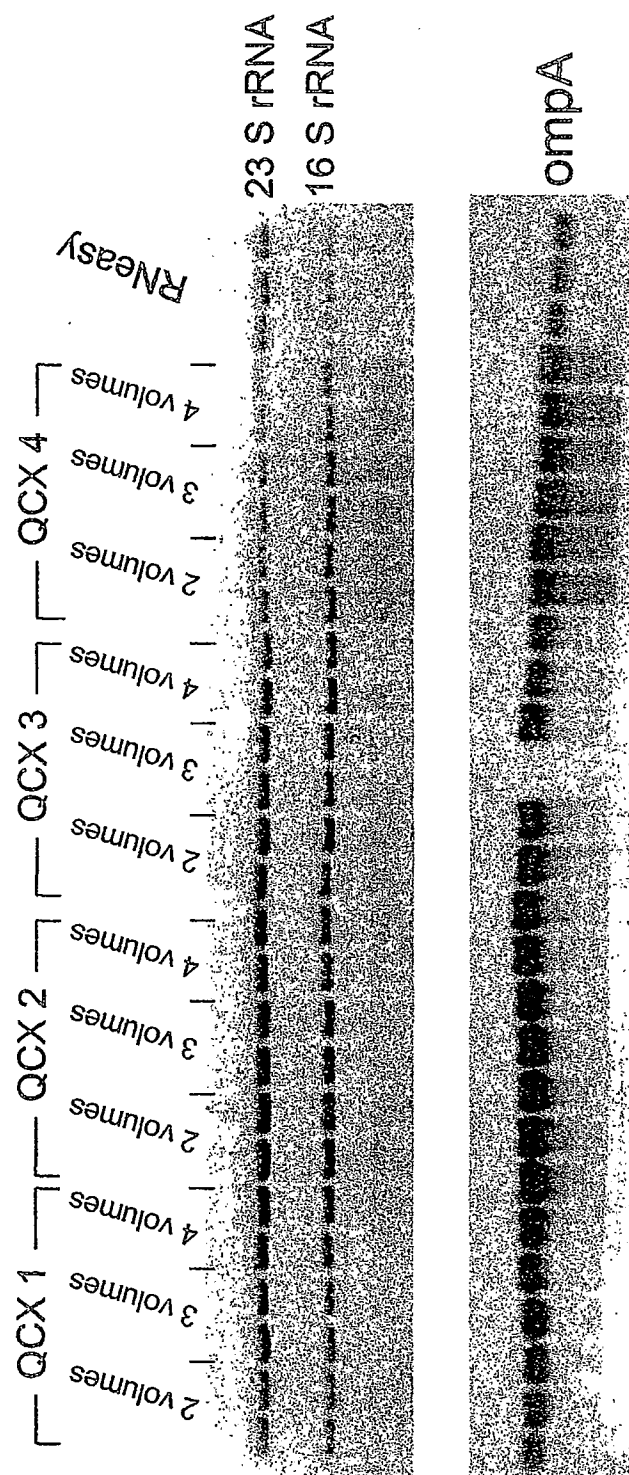


Fig. 4

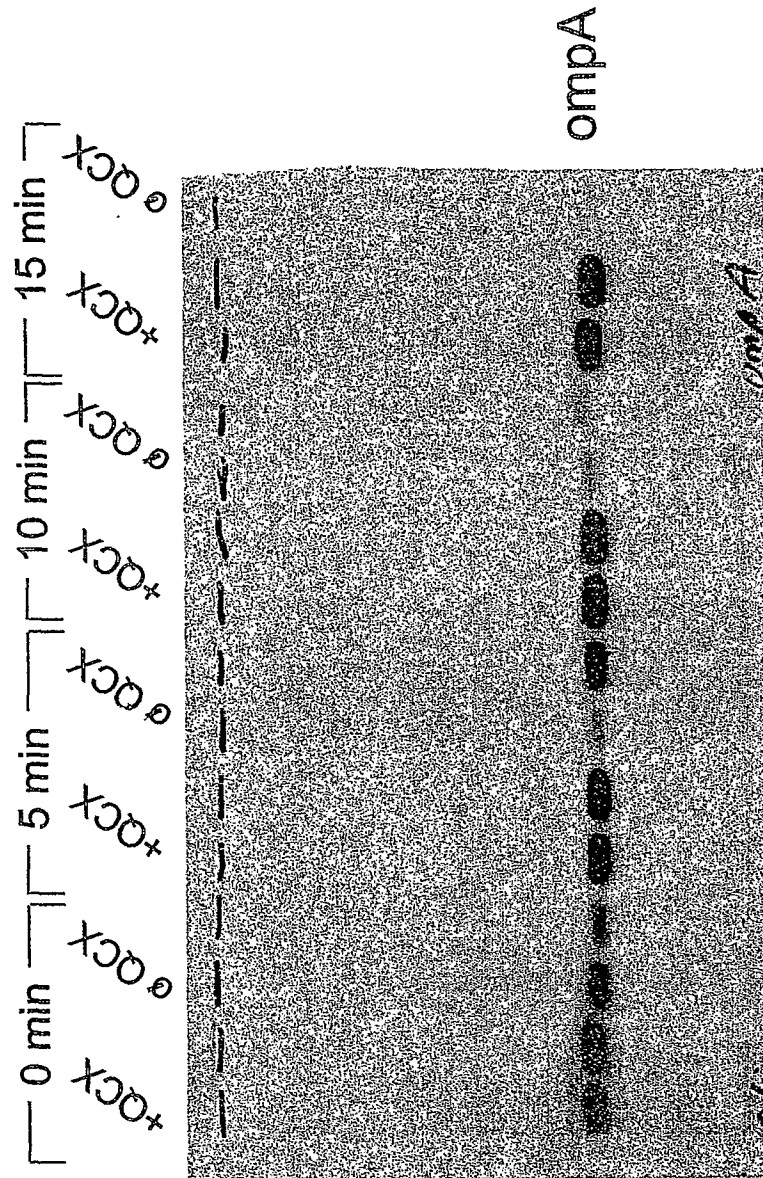


Fig. 5

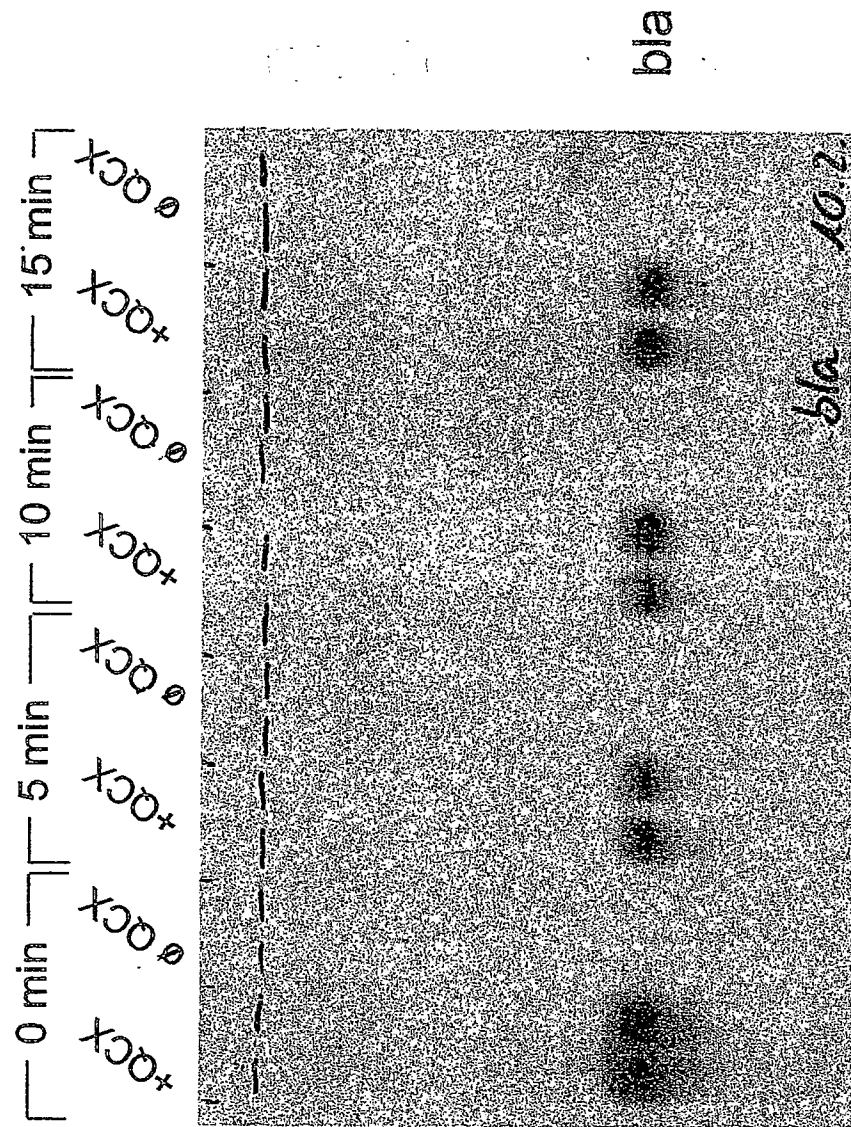


Fig. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int ional Application No

PCT/EP 01/07281

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07C211/62 C12N15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07C C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, BEILSTEIN Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 891 921 A (WALKER LEIGH E) 6 April 1999 (1999-04-06) column 6, line 64 - line 67 column 7, line 26 - line 30; claim 1; examples 162,162B,163,164	1-17
Y	GB 1 289 426 A (SHELL INT.) 20 September 1972 (1972-09-20) page 2, column 2, line 90 -page 3, column 1, line 18; claim 1	1-17
Y	US 5 275 708 A (AKINS JR ROBERT E ET AL) 4 January 1994 (1994-01-04) claims 1,2	1-17
Y	EP 0 606 712 A (CLOROX CO) 20 July 1994 (1994-07-20) claims 3,5,6,10; examples 1-3	1-17
	--- -/--	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 October 2001

Date of mailing of the international search report

09/11/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

SeeImann, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.

PCT/EP 01/07281

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 300 635 A (MACFARLANE DONALD E) 5 April 1994 (1994-04-05)	1-17
A	column 3, line 44 - line 52; examples 1,5 ---	18-38
Y	US 5 010 183 A (MACFARLANE DONALD E) 23 April 1991 (1991-04-23)	1-17
A	column 3, line 24 - line 42 column 4, line 34 - line 40; claim 2; examples 2,3 ---	18-38
A	REX CHISOLM: "Molecular Biology" INTERNET ARTICLE, 'Online! 26 January 1995 (1995-01-26), XP002159472 Retrieved from the Internet: <URL:<URL:http://www.dicty.cmb.nwu.edu/Chis_I...%20Manual/molecular_biolog.htm > 'retrieved on 2001-02-02! page 1 -page 2 page 8-10 -----	1-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/07281

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5891921	A	06-04-1999	US 5641726 A	24-06-1997
			AU 7107694 A	03-01-1995
			CA 2162128 A1	22-12-1994
			EP 1114704 A2	11-07-2001
			EP 1122044 A1	08-08-2001
			EP 1121857 A1	08-08-2001
			EP 0702517 A1	27-03-1996
			IL 109964 A	22-09-1999
			IL 122727 A	12-03-1999
			IL 122729 A	12-03-1999
			IL 122730 A	12-03-1999
			IL 124041 A	31-01-2000
			JP 8511543 T	03-12-1996
			NZ 268249 A	26-08-1998
			NZ 329861 A	29-07-1999
			WO 9428715 A1	22-12-1994
			US 5700841 A	23-12-1997
			US 6087303 A	11-07-2000
			ZA 9403999 A	03-02-1995
GB 1289426	A	20-09-1972	DE 2130679 A1	23-12-1971
			FR 2099266 A5	10-03-1972
US 5275708	A	04-01-1994	NONE	
EP 0606712	A	20-07-1994	BR 9305392 A	02-08-1994
			CA 2107939 A1	14-07-1994
			DE 69308010 D1	20-03-1997
			DE 69308010 T2	22-05-1997
			EP 0606712 A1	20-07-1994
			ES 2096872 T3	16-03-1997
			KR 227630 B1	01-11-1999
			MX 9308044 A1	31-08-1994
			US 5639722 A	17-06-1997
US 5300635	A	05-04-1994	AU 6230594 A	29-08-1994
			JP 8506340 T	09-07-1996
			US 5985572 A	16-11-1999
			WO 9418156 A1	18-08-1994
			US 5728822 A	17-03-1998
US 5010183	A	23-04-1991	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In: Nationales Aktenzeichen

Publ. EP 01/07281

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07C211/62 C12N15/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07C C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, BEILSTEIN Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US 5 891 921 A (WALKER LEIGH E) 6. April 1999 (1999-04-06) Spalte 6, Zeile 64 - Zeile 67 Spalte 7, Zeile 26 - Zeile 30; Anspruch 1; Beispiele 162, 162B, 163, 164 ----	1-17
Y	GB 1 289 426 A (SHELL INT.) 20. September 1972 (1972-09-20) Seite 2, Spalte 2, Zeile 90 - Seite 3, Spalte 1, Zeile 18; Anspruch 1 ----	1-17
Y	US 5 275 708 A (AKINS JR ROBERT E ET AL) 4. Januar 1994 (1994-01-04) Ansprüche 1, 2 ----	1-17
Y	EP 0 606 712 A (CLOROX CO) 20. Juli 1994 (1994-07-20) Ansprüche 3, 5, 6, 10; Beispiele 1-3 ----- -/-	1-17

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

31. Oktober 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

09/11/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Seelmann, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In: ionales Aktenzeichen

PCT/EP 01/07281

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US 5 300 635 A (MACFARLANE DONALD E) 5. April 1994 (1994-04-05)	1-17
A	Spalte 3, Zeile 44 - Zeile 52; Beispiele 1,5	18-38
Y	US 5 010 183 A (MACFARLANE DONALD E) 23. April 1991 (1991-04-23)	1-17
A	Spalte 3, Zeile 24 - Zeile 42 Spalte 4, Zeile 34 - Zeile 40; Anspruch 2; Beispiele 2,3	18-38
A	REX CHISOLM: "Molecular Biology" INTERNET ARTICLE, 'Online! 26. Januar 1995 (1995-01-26), XP002159472 Gefunden im Internet: <URL:<URL:http://www.dicty.cmb.nwu.edu/Chi s_I...%20Manual/molecular_biolog.htm > 'gefunden am 2001-02-02! Seite 1 -Seite 2 Seite 8-10	1-38

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/07281

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5891921	A	06-04-1999	US	5641726 A	24-06-1997
			AU	7107694 A	03-01-1995
			CA	2162128 A1	22-12-1994
			EP	1114704 A2	11-07-2001
			EP	1122044 A1	08-08-2001
			EP	1121857 A1	08-08-2001
			EP	0702517 A1	27-03-1996
			IL	109964 A	22-09-1999
			IL	122727 A	12-03-1999
			IL	122729 A	12-03-1999
			IL	122730 A	12-03-1999
			IL	124041 A	31-01-2000
			JP	8511543 T	03-12-1996
			NZ	268249 A	26-08-1998
			NZ	329861 A	29-07-1999
			WO	9428715 A1	22-12-1994
			US	5700841 A	23-12-1997
			US	6087303 A	11-07-2000
			ZA	9403999 A	03-02-1995
GB 1289426	A	20-09-1972	DE	2130679 A1	23-12-1971
			FR	2099266 A5	10-03-1972
US 5275708	A	04-01-1994	KEINE		
EP 0606712	A	20-07-1994	BR	9305392 A	02-08-1994
			CA	2107939 A1	14-07-1994
			DE	69308010 D1	20-03-1997
			DE	69308010 T2	22-05-1997
			EP	0606712 A1	20-07-1994
			ES	2096872 T3	16-03-1997
			KR	227630 B1	01-11-1999
			MX	9308044 A1	31-08-1994
			US	5639722 A	17-06-1997
US 5300635	A	05-04-1994	AU	6230594 A	29-08-1994
			JP	8506340 T	09-07-1996
			US	5985572 A	16-11-1999
			WO	9418156 A1	18-08-1994
			US	5728822 A	17-03-1998
US 5010183	A	23-04-1991	KEINE		